

SC/C/740

R. Bc. 57935



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

**PROTEINAS FtsQ, FtsA Y FtsZ.
TRES COMPONENTES ESENCIALES DEL SEPTADOR DE
*Escherichia coli***

MANUEL SANCHEZ ANGULO

MADRID 1993

PROTEINAS FtsQ, FtsA Y FtsZ.
TRES COMPONENTES ESENCIALES DEL SEPTADOR DE
Escherichia coli

Autor: MANUEL SANCHEZ ANGULO

Director: MIGUEL VICENTE

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
1993

*"Es en las criaturas más pequeñas
donde encontramos todo el esplendor de la Naturaleza"*

Plinio el Viejo.

Son muchas las personas que han contribuido a la elaboración de esta tesis tanto directa como indirectamente.

Los primeros de todos han sido mis compañeros de laboratorio a lo largo de estos años que no solo me han aguantado sino que además me dieron su amistad. Miguel Vicente que la ha dirigido y ha sido el que más la ha padecido. Pilar Palacios por sus ánimos cuando las cosas se ponían negras. Teresa y Martí porque gracias a ellos la tesis va completa. MariJose, Ana Dopazo, Anita, Jesús, Jordi, Lucí, Pilar Z., Manu, Mari, Julio, Luis, Laura, Concha, Nieves, Miguel, Rizos y Mercedes que consiguieron mantener esa atmósfera tan especial y maravillosa que caracteriza a la unidad 3M.

Los siguientes no trabajaron conmigo pero gracias a ellos pude superar todos los malos momentos y celebrar los buenos. Manolo, Clemente, Luchi, Angel, Chiqui, Luigi, Blanca, Angela, Juan, Encarna, Pili, Pati, Rudi, Olga, Juande, y seguramente alguno más que me dejaré en el tintero, gracias por esos buenos momentos.

Quiero dar las gracias también al profesor A. Cozzone y al doctor B. Bukau por permitirme trabajar en sus laboratorios. A Silvie, Bertrand, MarieCristine, Casilda, Anne, Hatwrig, y Alex por hacer acogedoras tierras extrañas. A Mada, secretaria del C-10, por encontrar los créditos que faltaban sin haber perdido su sonrisa y amabilidad. A Antonio Tormo por ser el causante de que aterrizase en el grupo de Miguel. A los "Ramones" y "Javieres" por sus prestamos y por los divertidos ratos pasados.

A todos ellos, muchas gracias.



A Elena
A mi familia

INDICE

	<u>Página</u>
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	9
MATERIALES	11
1. MATERIAL BIOLOGICO	12
1.1. Estirpes bacterianas	12
1.2. Plásmidos	12
1.3. Antisueros	12
2. MATERIAL QUIMICO Y BIOQUIMICO	12
METODOS	18
1. Crecimiento de estirpes bacterianas	18
2. Transformación bacteriana	18
3. Manejo de DNA y RNA	18
4. Ensayos de titulación de niveles de transcripción	21
5. Clonaje de los genes <i>ftsA</i> y <i>ftsQ</i> .	22
6. Construcción de los hiperproductores de FtsA, FtsA101 y FtsA102.	25

7. Construcción de los hiperproductores de FtsQ, FtsQ11 y FtsQ12	25
8. Construcción de un mutante termonulo para el gen <i>ftsQ</i> .	25
9. Obtención de fracciones celulares.	27
10. Técnicas electroforéticas	28
10.1. Electroforesis de DNA	28
10.2. Electroforesis de proteínas	28
11. Transferencia de proteínas a membrana	28
12. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana	29
13. Marcaje radiactivo de proteínas.	29
14. Inmunoprecipitación de FtsZ.	29
15. Preadсорción de los sueros policlonales.	30
16. Cromatografía de afinidad en ATP-agarosa.	31
RESULTADOS	32
1. LA PROTEINA FtsA PRESENTA UNA CAPACIDAD DE UNION A ATP QUE ESTA RELACIONADA CON SU ESTADO DE FOSFORILACION Y CON SU LOCALIZACION CELULAR	33
1.1. La proteína FtsA se localiza en la membrana y en el citoplasma.	33
1.2. En la célula existen dos formas de FtsA en localizaciones distintas	36

1.3. La proteína FtsA tiene capacidad de unión a ATP dependiente del estado de fosforilación de la proteína	45
 2. LA PROTEINA FtsZ ES UN FACTOR LIMITANTE DE LA DIVISION, CUYA TRANSCRIPCION OSCILA DURANTE EL CICLO CELULAR	 53
2.1. La vida media de FtsZ es superior a un tiempo de generación.	53
2.2. La transcripción de FtsZ oscila durante el ciclo celular.	58
2.3. La proteína FtsZ es un factor limitante de la división celular	62
 3. FtsQ ES UNA PROTEINA INTEGRADA EN LA MEMBRANA CITOPLASMATICA, ESENCIAL PARA LA DIVISION CELULAR	 64
3.1. FtsQ se localiza en la membrana citoplasmática de <i>E. coli</i>	64
3.2. La región hidrofóbica de FtsQ es importante tanto para su localización como para su función.	67
 DISCUSION	 70
 RESUMEN	 81
 BIBLIOGRAFIA	 83

ABREVIATURAS

Amp	Resistencia a ampicilina
Cam	Resistencia a cloranfenicol
cRNA	Acido ribonucleico competidor
DAB	Diaminobenzidina
D.O.	Densidad óptica
Gel 2D	Electroforesis bidimensional
IEF	Isoelectroenfoque
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranósido
Kan	Resistencia a Kanamicina
kb	Kilopares de bases
pb	Pares de bases
PBP	Proteína fijadora de penicilina
PBS	Tampón fosfato-salino
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TCA	Acido tricloro-acético
Tet	Resistencia a kanamicina
TRIS	Trihidroximetil-amino-metano
ts	Sensibilidad a temperatura

INTRODUCCION

La bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* es, posiblemente, el organismo vivo mejor conocido por la biología contemporánea, tanto a nivel genético como bioquímico. A ello ha contribuido el ser un organismo unicelular de fácil manejo en el laboratorio y tener tiempos de generación muy cortos de hasta un mínimo de 20 minutos en medio rico. Ese tiempo basta a *E. coli* para duplicar no sólo su DNA, sino también todo su contenido enzimático y repartirlo con gran exactitud entre sus dos células hijas. Tras la división celular tenemos dos bacterias con todo lo necesario para sobrevivir y dividirse de nuevo. La división celular es por tanto una de las etapas cruciales en la vida de una bacteria, y no es de extrañar que haya un gran número de genes involucrados directa o indirectamente en su desarrollo. La figura 1 muestra la posición dentro del cromosoma de *E. coli* de grupos de genes conocidos relacionados con la división celular. La mayor parte de estos genes son esenciales para la bacteria, por lo que muchos de ellos han sido descritos gracias a mutaciones condicionales (62). Algunos de estos genes parecen intervenir en otros procesos celulares cuya alteración puede afectar a la división celular. Los productos de los genes *lon*, *ruvA*, *sulA*, *recA* y *lexA* están implicados en el bloqueo de la división celular asociado a la respuesta SOS tras un daño al DNA, pero este sistema no parece intervenir en la regulación de la división celular en circunstancias normales. (47, 52) El operón del minuto 76 compuesto por los genes *ftsS*, *Y*, *E*, y *X*, parece realizar una función de coordinación de la división celular con los genes *dnaK* y *rpoH*, implicados en la respuesta a choque térmico, y con genes del mecanismo de translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática (37). Hay también otros genes que alteran el metabolismo de las envolturas celulares, como *fadR*, *mreB* (77, 81) y el agrupamiento del minuto 15 implicado en la elongación celular y compuesto por los genes *dacA*, *rodA* y *pbpA*.(29)

Los genes directamente relacionados con el proceso de división celular parecen estar agrupados en dos posiciones. En el minuto 26 se localiza el operón *minCDE* cuya función es la inactivación de los sitios de septación en los polos, una vez completada la división celular (23, 24, 25). El otro agrupamiento es en el minuto 2.5 y comprende a un gran número de genes involucrados en la septación entre los que se encuentra el gen *pbpB* y los tres genes objeto de nuestro estudio, *ftsQ*, *ftsA* y *ftsZ*. La falta de función de estos genes produce la filamentación celular debido a que la célula continua su crecimiento pero es incapaz de dividirse. El gen *pbpB* codifica para la proteína PBP3. Esta proteína es la responsable de la síntesis del peptidoglicano septal durante la división celular. Los genes *ftsQ*, *A*, y *Z* codifican para productos requeridos para la septación y están agrupados formando el operón *fts* (78). La figura 2 muestra la localización de los distintos promotores mapeados y de los sitios de inicio de transcripción. Existen dos promotores para *ftsQ* y cuatro para *ftsZ*, siendo el gen *ftsA* el único sin promotores propios. Este hecho junto con el dato de que el codon de terminación de *ftsQ* y el codon de

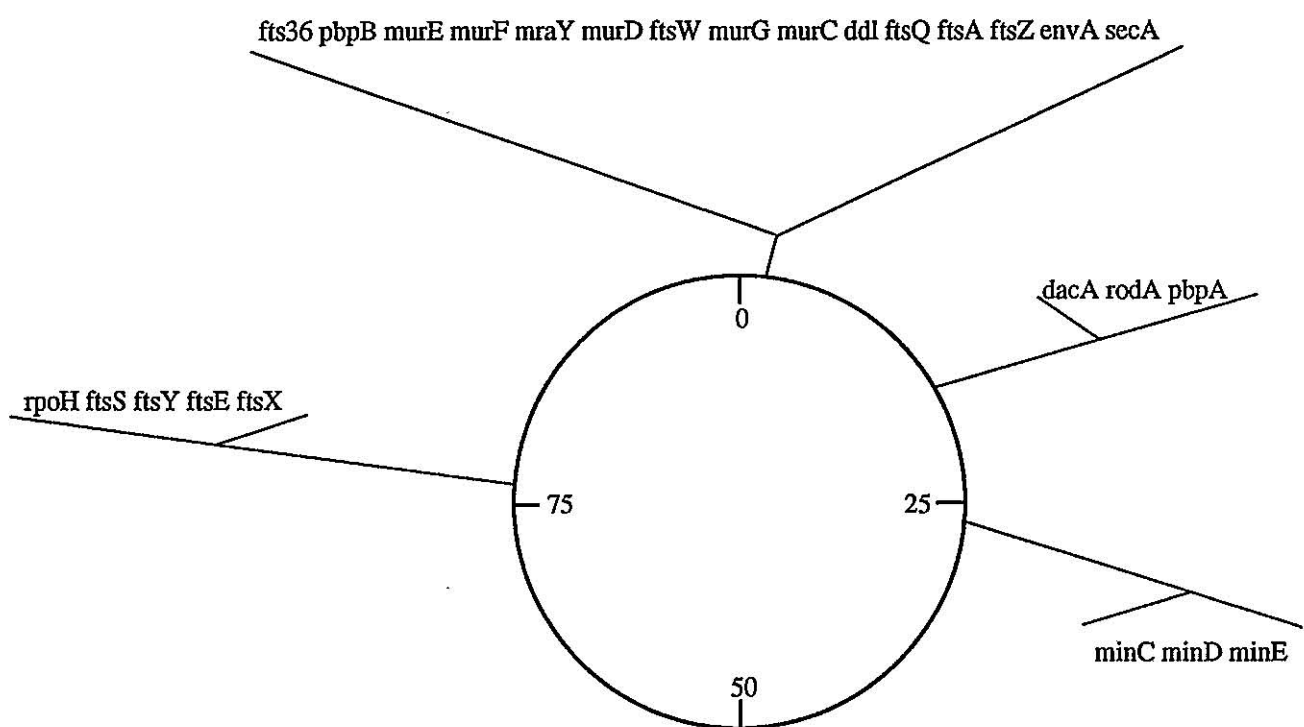


Figura 1: Mapa de los genes de división en *E. coli*.

Mapa genético de *E. coli* mostrando los loci con efectos sobre la división celular. Destacan los agrupamientos del minuto 2.5 y 76, y un agrupamiento en el minuto 15 que contiene genes implicados en la elongación celular.

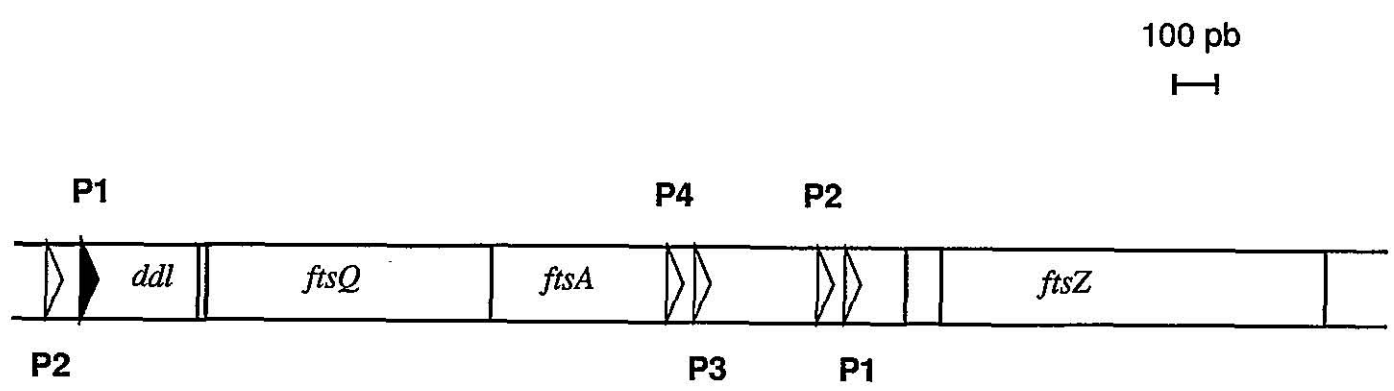


Figura 2: Mapa del operón *ftsQAZ*.

Se muestra un esquema de los genes contenidos en el operón *ftsQAZ* y los promotores identificados hasta el momento (puntas de flecha). El promotor *ftsQ1p* (flecha negra) es el promotor *gearbox*.

iniciación de *ftsA* solapan en una base sugiere que la expresión de estos genes podría llevarse a cabo mediante una transcripción y una traducción acopladas (64). La transcripción iniciada en *ftsQ* llega hasta el gen *ftsZ* debido a la ausencia de terminadores de transcripción entre estos genes.(1, 35).

Como la división celular ocurre una vez cada tiempo de generación, podría esperarse que la síntesis de los productos requeridos para este proceso fuera una cantidad constante por célula y ciclo independientemente del tiempo de generación. Por ello, la expresión de estos genes será inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento. Uno de los promotores que está delante del gen *ftsQ*, el promotor *ftsQ1p*, es un promotor *gearbox* que funciona de esta forma (1). El promotor *gearbox* actúa en combinación con el promotor *ftsQ2p*, más parecido al promotor consenso. Este último se encuentra delante del promotor *gearbox*. Los otros promotores que se encuentran en el operón están dentro de la secuencia del gen *ftsA* y sólo regulan la expresión del gen *ftsZ*. No se han encontrado promotores exclusivos para *ftsA* por lo que parece que la expresión de este gen es a partir de los promotores de *ftsQ* (1). Sin embargo los niveles celulares de estas tres proteínas son bastante dispares entre si. Se ha calculado que cada célula contiene unas 30 moléculas de FtsQ (70), 150 moléculas de FtsA (82) y 5000 de FtsZ (Este trabajo). En el caso de FtsZ, la diferencia parece ser debida a que la mayor parte de la transcripción del gen es a partir de los promotores proximales (este trabajo). Los niveles de los genes *ftsQ* y *ftsA* que se cotranscriben, podría ser explicado tanto por diferencias en la regulación postranscripcional como por diferente vida media de cada proteína.

Poco se conoce sobre la función del producto del gen *ftsQ*, aparte de ser esencial en una etapa temprana de la división celular (10). Esta proteína se localiza en la membrana citoplasmática (32, este trabajo), lugar donde se localizan otras proteínas esenciales para la división celular como PBP3 (69), y FtsA (este trabajo). Recientemente se ha descrito que la hiperproducción de FtsQ en mutantes *pbpB*, *ftsA*, o *ftsZ* es nociva para la célula (22) al contrario de lo que sucede en células normales (32, este trabajo). Esto permite aventurar la hipótesis de una interacción entre esta proteína con las demás.

El producto del gen *ftsA* se necesita en las etapas finales de la formación del septo, ya que los mutantes en este gen forman filamentos con constricciones visibles a intervalos regulares, a diferencia de lo que ocurre en mutantes *ftsQ* o *ftsZ*, (80) que no presentan estas constricciones. La proteína FtsA es un componente estructural del septo (75) que interacciona con PBP3 (71). Asimismo, FtsA tiene un papel regulador durante los últimos estadios del ciclo de división celular como parte de la ruta TER, un mecanismo que coordina la replicación del cromosoma y la septación por una ruta independiente de la respuesta SOS. (28, 73, 74, 75). Las diferentes homologías descritas para esta proteína con kinasas de levaduras (63) activadas por fosforilación,

o con una familia de proteínas que unen ATP (14) han permitido iniciar el estudio del papel bioquímico de FtsA y postular un modelo de su actuación en la célula (ver resultados).

El producto del gen *ftsZ* es el mejor conocido de los tres. Es también un gen esencial, y como los anteriores, su falta conduce a la filamentación de la célula, (58). Al parecer el nivel de la proteína FtsZ puede regular la división celular. Ward y Lutkenhaus (83) demostraron que tras clonar el gen *ftsZ*, el aumento de dos a siete veces del nivel fisiológico normal de la proteína FtsZ producía la filamentación celular y la formación de minicélulas. Asimismo se conoce que la inactivación de los sitios de septación en los polos por los productos del operón *minCDE* es a través de su acción sobre FtsZ (48). No son las únicas proteínas con las que interacciona FtsZ. Es también el blanco de SulA, el inhibidor de la división celular durante la respuesta SOS (42, 47) y parece interactuar con PBP3 (4). Esta proteína aunque se localiza en las fracciones citoplasmáticas (este trabajo) parece ejercer su acción en la membrana tal como permiten postular las observaciones realizadas mediante técnicas de inmunomicroscopía electrónica, que permiten observar a la proteína FtsZ formando un anillo alrededor del futuro sitio de septación (12). Recientemente se ha observado que la proteína FtsZ posee una actividad GTPásica, lo que quizás conduzca al esclarecimiento de su función. (26, 53, 60)

Se ha postulado que las proteínas FtsQ, FtsA, FtsZ y PBP3, interaccionan entre ellas formando el septador, un complejo presente en la envoltura celular y responsable de la formación del septo durante la división celular (Figura 3) (78). Dai y Lutkenhaus estudiando el efecto de la hiperproducción de estas proteínas en mutantes de los mismos genes, han encontrado que la inhibición de la división producida por la hiperproducción de FtsZ puede ser suprimida por un aumento de la cantidad celular de FtsA (22). Por otra parte, la hiperproducción de FtsQ no produce ninguna alteración morfológica (31, 32, este trabajo) a menos que se produzca en mutantes *ftsZ*, *ftsA*, o *pbbB*.

El hecho de que se hayan encontrado genes homólogos a los del operón *ftsQAZ* en otras bacterias tanto gram-negativas como gram-positivas, (7, 8), induce a pensar que el mecanismo de división celular ha sido conservado en diferentes microorganismos. Queda por saber si la división bacteriana representa el mismo proceso que la citocinesis en organismos superiores.

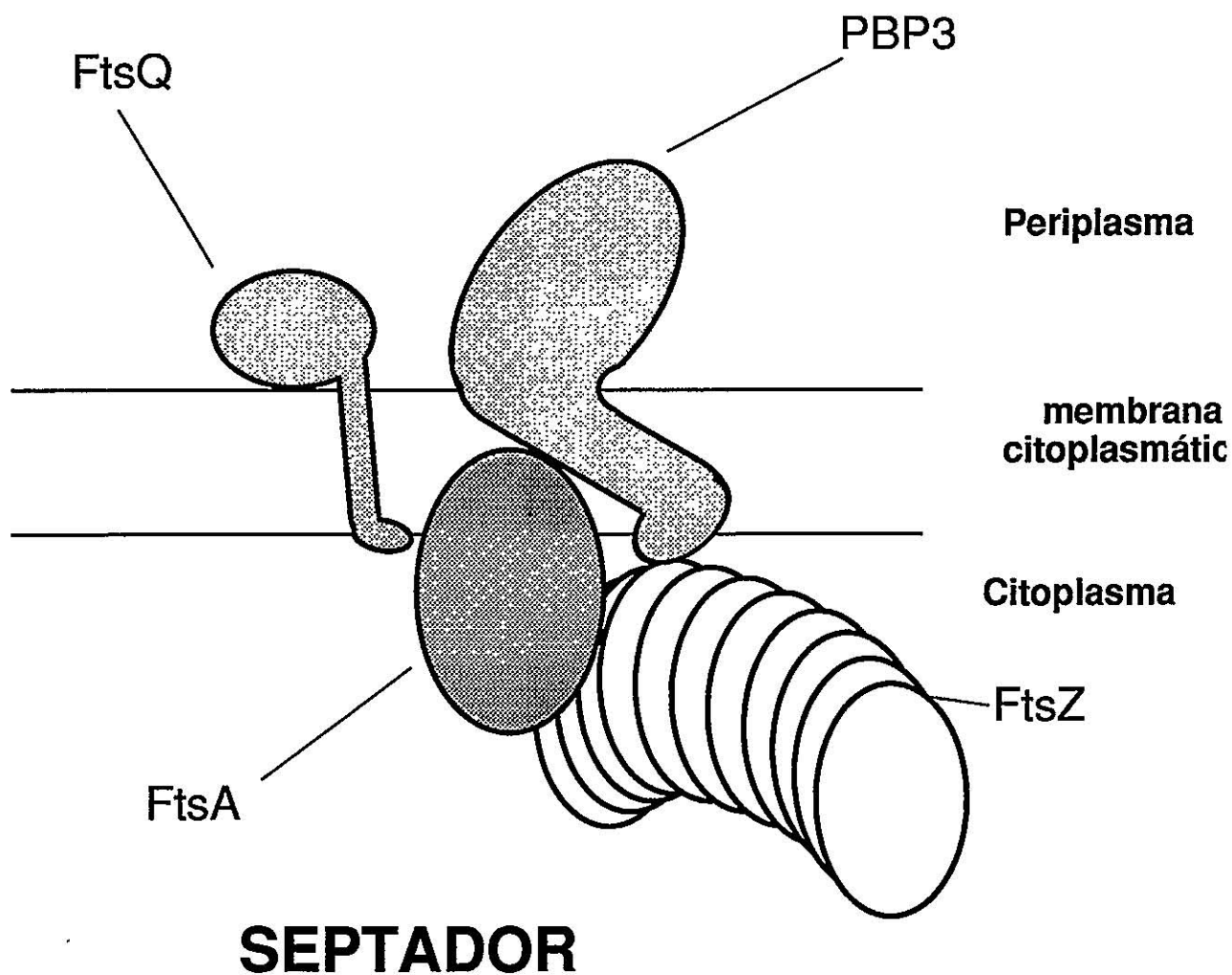


Figura 3: Estructura del septador.

El septador es una estructura activa durante la división celular en la que participan al menos cuatro proteínas: PBP3, FtsQ, FtsA y FtsZ., que interaccionarían entre sí y se localizarían en la membrana citoplasmática.

OBJETIVOS

En el presente trabajo hemos pretendido dilucidar el papel de las proteínas FtsQ, FtsA y FtsZ durante el proceso de septación, así como de otros factores que pudieran regular su acción, mediante los siguientes objetivos:

- Comprobar si la proteína FtsA era una proteína susceptible de fosforilación de manera similar a algunas kinasas del ciclo celular de levaduras (63). Asimismo, determinar si FtsA pertenece a la familia de proteínas que unen ATP descrita por Sander y colaboradores, (14). Posteriormente y en base a los resultados obtenidos hemos postulado un modelo funcional y estructural de la proteína FtsA
- Determinar que promotores gobiernan la transcripción del gen *ftsZ* y cómo se expresa a lo largo del ciclo celular. Dado que un aumento de los niveles de FtsZ produce una filamentación celular y la formación de minicélulas, hemos querido determinar los niveles de la proteína FtsZ y si es un factor limitante de la división celular.
- Por último hemos pretendido determinar la localización celular de FtsQ en condiciones fisiológicas y estudiar el papel de la región hidrofóbica de FtsQ en la localización y funcionalidad de la misma.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. MATERIAL BIOLOGICO

1.1 Estirpes bacterianas.

En este trabajo, se han utilizado las estirpes de *E. coli* que se indican en la tabla 1, donde también se detalla su genotipo y procedencia o referencia bibliográfica.

1.2 Plásmidos.

Se indican en la tabla 2, junto con sus características más sobresalientes, procedencia o referencia bibliográfica.

1.4 Antisueros.

La tabla 3 recoge las características de los antisueros empleados en este trabajo.

2. MATERIAL QUIMICO Y BIOQUIMICO

Las endonucleasas de restricción y demás enzimas utilizadas en el manejo de DNA o RNA provinieron de Boehringer Mannheim y se utilizaron siguiendo las instrucciones del proveedor. También se utilizó Xgal, imidazol, e IPTG de esta casa comercial. La RNasa y lisozima, así como los antibióticos kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina, proceden de Sigma. La fosfatasa alcalina inmovilizada y su protocolo de uso provienen de USB. La ampicilina fue un obsequio de Antibióticos, S.A.

Los productos empleados en la elaboración de medios de cultivo: extracto de levadura, agar, proteasa peptona y bactotripton proceden de Difco.

Se emplearon acrilamida, N-N'-metilen-bisacrilamida, urea, TEMED y persulfato amónico de Biorad. La agarosa fue un obsequio de Hispanagar, S.A. Para los IEFs se usó acrilamida especial para biología molecular de MERCK y anfolitos "Biolyte 5-7" de Biorad y "Pharmalyte 3-10" de Sigma. En la secuenciación por el método de los dideoxinucleótidos se utilizó el *kit* de "Sequenase v 2.0" comercializado por United States Biochemical Co. También se usó el *kit* de secuenciación de Boehringer Mannheim.

TABLA 1: Estirpes

Estirpe	Fenotipo	Referencia
B/rK	F ⁻ <i>malB</i>	44
D2	Como OV2, <i>ftsA2(ts)</i> , <i>leu</i> ⁺	74
D3	Como OV2, <i>ftsA3(ts)</i> , <i>leu</i> ⁺	74
KJB22	F ⁻ <i>thi1</i> , <i>thr1</i> , <i>proA2</i> , <i>his4</i> , <i>argE3</i> , <i>met</i> , <i>thyA</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>sup37</i> , <i>ara14</i> , <i>xy15</i> , <i>ntl1</i> , <i>rps(str31)</i> , <i>tsx33</i> , <i>ftsQ1</i> .	K.J. Begg
MC1061	F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ (<i>lac</i>)X74 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>strA</i>	18
OV2	F ⁻ <i>ilv</i> , <i>leu</i> , <i>thyA(deo)</i> , <i>his</i> , <i>ara(Am)</i> , <i>lac125(Am)</i> , <i>galE</i> , <i>trp(Am)</i> , <i>tsx(Am)</i> , <i>tyrT(supFA81 ts)</i>	30
OV16	como OV2, <i>ftsA16(Am)</i>	
RZ1032	F ⁻ <i>dut</i> , <i>ung</i> , <i>thi1</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>zbd279::Tn10</i>	Felipe Moreno.
VIP2	MC1061 Δ <i>ftsZ::kan</i> conteniendo pLAR91	58
VIP86	RZ1032 conteniendo pJPV180	Este trabajo
VIP87	RZ1032 conteniendo pJPV1000	Este trabajo
VIP146	MC1061 conteniendo pJF11HE	Este trabajo
VIP147	MC1061 conteniendo pMSV7	Este trabajo
VIP148	MC1061 conteniendo pMSV71	Este trabajo
VIP149	MC1061 conteniendo pMSV72	Este trabajo
VIP194	MC1061 conteniendo pMSV11	Este trabajo
VIP195	MC1061 conteniendo pMSV12	Este trabajo
VIP205	MC1061 <i>tacP::ftsZ</i>	Pilar Palacios y Martí Aldea
VIP226	MC1061 conteniendo pJPV7	Este trabajo
VIP210	MC1061 Δ <i>ftsQ::kan</i> conteniendo pMPV4	Este trabajo
VIP240	MC1061 conteniendo pMFV20	M ^a José Ferrándiz
W3110	Estirpe salvaje	5

Tabla 2: Plásmidos.

Nombre	Características relevantes	Procedencia
pBR322	Tet, Amp.	13
pEMBL18	Amp	27
pJF119HE	Amp, <i>tacp</i> , <i>lacI^q</i> .	34
pJPVZ	Fusión <i>cro'</i> :: <i>ftsZ</i> bajo control de P_R y <i>cl857</i> .	58
pJPV7	Gen <i>ftsQ</i> bajo control de P_R y <i>cl857</i> .	Jesús Plá
pJPV181	Clonaje del gen <i>ftsA</i> ⁺ en pEMBL18	Este trabajo
pJPV1000	Clonaje del gen <i>ftsQ</i> ⁺ en pEMBL18	Este trabajo
pMAK700	<i>rep(ts)</i> , Cam	38
pMFV20	Sobreexpresión del gen <i>ftsA102</i> bajo control de <i>tacp</i> y <i>lacI^q</i> , como en pMSV11.	M ^a Jose Ferrandiz
pMPV1	Construcción de <i>ftsQ</i> :: <i>kan</i>	Este trabajo
pMPV3	Clonaje de <i>ftsQ</i> :: <i>kan</i> en pMAK700	Este trabajo
pMPV4	Igual que el pMPV3, pero conteniendo el gen <i>ftsQ</i> ⁺ procedente de una recombinación cromosómica	Este trabajo
pMSV1	Alelo <i>ftsA101</i> clonado en pEMBL18	Este trabajo
pMSV2	Alelo <i>ftsQ11</i> clonado en pEMBL18	Este trabajo
pMSV3	Alelo <i>ftsQ12</i> clonado en pEMBL18	Este trabajo
pMSV5	Clonaje del gen <i>ftsA</i> en pBR322	Este trabajo
pMSV6	Clonaje del gen <i>ftsQ</i> en pBR322.	Este trabajo
pMSV7	Sobreexpresión del gen <i>ftsQ</i> bajo control de <i>tacp</i> y <i>lacI^q</i> .	Este trabajo
pMSV11	Sobreexpresión del gen <i>ftsA</i> bajo control de <i>tacp</i> y <i>lacI^q</i> .	Este trabajo

Tabla 2: Plásmidos (continuación)

Nombre	Características relevantes	Procedencia
pMSV12	Sobreexpresión del gen <i>ftsA101</i> bajo control de <i>tacp</i> y <i>lacI^q</i> , como en pMSV11.	Este trabajo
pMSV51	Alelo <i>ftsA101</i> clonado en pBR322, como en pMSV5.	Este trabajo
pMSV61	Clonaje de <i>ftsQ11</i> en pBR322, como en pMSV6	Este trabajo
pMSV62	Clonaje de <i>ftsQ12</i> en pBR322, como en pMSV6	Este trabajo
pMSV71	Sobreexpresión del gen <i>ftsQ11</i> bajo control de <i>tacp</i> y <i>lacI^q</i> , como en pMSV7.	Este trabajo
pMSV72	Sobreexpresión del gen <i>ftsQ12</i> bajo control de <i>tacp</i> y <i>lacI^q</i> , como en pMSV7.	Este trabajo
pUC4K	Kan	79
pZAQ	Tet, <i>ftsQAZ</i>	83

Tabla 3: Antisueros.

Nombre	Características	Referencia
MVJ-1	anti EF-Tu.	57
MVJ-2	anti Cro-FtsA. Usado en la detección de FtsA.	57
MVJ-9	anti Cro-FtsZ. Usado en la detección de FtsZ.	58
MVJ-11	anti β -gal-FtsQ. Usado en la detección de FtsQ.	32

Los productos radiactivos usados fueron [32 P]ortofosfato sodico (10 mCi/ml), [35 S]dATP (>1000 Ci/mmol) y L- 35 S]Metionina (1 Ci/mmol) de la casa Amersham.

Para las cromatografías de afinidad se usó ATP-agarosa (A2767) y AMP-agarosa (A1271) de Sigma. La Proteína A-agarosa también provenía de esta casa. El resto de los productos químicos utilizados provinieron de las firmas comerciales Merck, Sigma y Probus.

METODOS

1. CRECIMIENTO DE ESTIRPES BACTERIANAS

Rutinariamente y salvo indicación expresa, se usó medio rico, LB (líquido) o LAT (sólido), para el crecimiento de las estirpes bacterianas (46). Como medios mínimos se utilizaron medio B (20) en el marcaje con ^{32}P , y medio M9 (51) con 0.2% de glucosa en el marcaje de proteínas con L- ^{35}S]Metionina, suplementados con 50 $\mu\text{g/ml}$ del aminoácido que requiriese la estirpe y 2 $\mu\text{g/ml}$ de tiamina. Los distintos medios se suplementaron con antibióticos cuando fue necesario (50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, 20 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, 20 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol). El crecimiento en masa de los cultivos se midió por turbidimetría; para ello se siguió la variación de la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un espectrofotómetro Guilford N-305 Microsampler. Cuando tuvo que inducirse la producción de una proteína por adición de IPTG, y a menos que se indique lo contrario, éste se añadía rutinariamente cuando el cultivo alcanzaba una $\text{DO}_{600} = 0.1$ (aproximadamente 2×10^7 células/ml), a una concentración final de 1 mM y se mantenía durante 2 horas. Los cultivos sincrónicos de la estirpe B/rK fueron obtenidos por el procedimiento de Helmstetter (40). Las concentraciones celulares y distribuciones de volumen celular se midieron, previo fijado de las muestras de cultivo en formaldehído al 0.6%, en un aparato Coulter Counter ZM, con orificio de 30 μm y un Channelyzer C1000 (Coulter Electronics).

2. TRANSFORMACION BACTERIANA.

Tanto para la obtención de células competentes como para la transformación de las mismas se siguió el método de Hanahan (39).

3. MANEJO DE DNA Y RNA

Se usaron las técnicas de manejo y purificación de DNA descritas en Maniatis *et al.* (50). La ligación de fragmentos de DNA se llevó a cabo según describen Dugaiczyc *et al.* (33). En los casos requeridos, los extremos se hicieron romos utilizando los deoxinucleótidos necesarios en cada caso y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. La purificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo con el *kit* "GeneClean" de BIO101. Los oligonucleótidos usados como cebadores para secuenciación, titulación de transcripción, PCR y mutagénesis dirigida están descritos en la tabla 4 y la figura 4. Todos fueron obtenidos mediante síntesis artificial. Para la

Tabla 4: Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Utilidad
AR-1	AAACATCGTCAAAGCGG	Secuenciación de <i>ftsA</i> . Cortesía de A. Robinson
JP-1	GCCGTTTTTGCCGGTGGG	Construcción alelo <i>ftsA101</i> mediante mutagénesis dirigida.
JP-3	TTCCTGGTGACCGTTTTAACGACAGTGGTGGTGAGC	Construcción alelos <i>ftsQ11</i> y <i>ftsQ12</i> mediante mutagénesis dirigida
JP-4	AACTGGCGGACTAATATG	Secuenciación de <i>ftsQ</i>
MA-8	GCCTCGAAACCCAAATTCCAGTCA	Cebador inverso usado en la cuantificación del mRNA de <i>ftsZ</i> .
MA-9	GAAGTGCCGAGCGTAGGTGGTCGT	Cebador usado en la mutagénesis dirigida por PCR, en la secuenciación de <i>ftsA</i> y en la cuantificación del mRNA de <i>ftsZ</i> .
MA-10	CGTTGTGGGCTGAAAGTTGACCAA	Cebador usado en la cuantificación del mRNA de <i>ftsZ</i> .
MS-1	AACCGATGGCGCAGCGCA	Construcción alelo <i>ftsA102</i> mediante mutagénesis dirigida por PCR
MS-2	TGCGCCATCGGTTAATACA	Construcción alelo <i>ftsA102</i> mediante mutagénesis dirigida por PCR
TG-2	CCGACGATGATTACGGCCTCAGGC	Cebador usado en la cuantificación del mRNA de <i>ftsZ</i> .
TG-3	TAGCACAAAGAGCCTCGA	Cebador usado en la cuantificación del mRNA de <i>ftsZ</i> .

Para más detalles ver materiales y métodos y la figura 4.

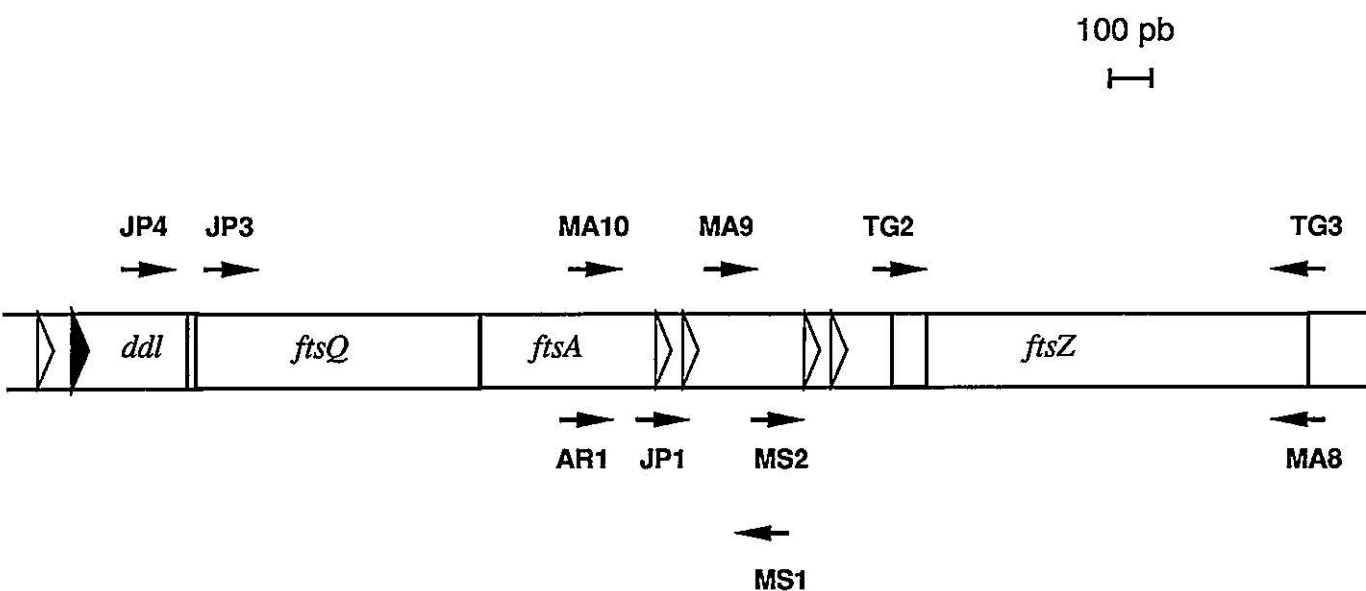


Figura 4: Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Mapa del operón *fts*. Las flechas representan los diferentes oligonucleótidos utilizados a lo largo de este trabajo y su orientación.

secuenciación de DNA se siguió el método de los dideoxinucleótidos de Sanger *et al.* (67) y utilizando el *kit* de "sequenase v 2.0" o el *kit* de secuenciación de Boehringer Mannheim, según se describe en 'M13 cloning and sequencing systems. A laboratory manual' (New England Biolabs).

Los métodos de mutagénesis dirigida usados fueron dos. Para construir las mutaciones *ftsQ11*, *ftsQ12* y *ftsA101* se usó la técnica basada en la construcción de un DNA molde conteniendo un pequeño número de uracilos, utilizando la estirpe RZ1032 y los plásmidos pJPV181(*ftsA*⁺) y pJPV1000(*ftsQ*⁺) como moldes (ver más adelante los detalles sobre estos plásmidos). En el caso del gen *ftsA* se usó el oligonucleótido JP-1 obteniéndose el plásmido pMSV1(*ftsA101*) tras la mutagénesis. Sobre *ftsQ* se usó el oligonucleótido JP-3 obteniéndose las mutaciones *ftsQ11* y *ftsQ12* clonadas en los plásmidos pMSV2 y pMSV3 respectivamente. Para la construcción de la mutación *ftsA102* se usó la técnica de mutagénesis dirigida por PCR en pasos secuenciales, usando como molde el plásmido pMSV20(*ftsA*⁺) (ver más adelante), y los oligonucleótidos MS-1 y MS-2. Se obtuvo así la mutación *ftsA102*, clonada en el plásmido pMFV1. Ambas técnicas están descritas en el capítulo 8 de Ausubel *et al.* (3).

El aislamiento de RNA total libre de DNA de células de *E. coli* fue desarrollado combinando la extracción con fenol ácido descrita por Kedzierski y Porter (43) con métodos estándares de preparación de RNA (3, T. Garrido, comunicación personal).

El RNA competidor usado en el ensayo de titulación de transcripción fue obtenido por Martí Aldea y Teresa Garrido. Este cRNA proviene de la transcripción *in vitro* usando T7 RNA polimerasa de una delección interna del gen *ftsZ*.

4. ENSAYOS DE TITULACION DE NIVELES DE TRANSCRIPCION

Se ha usado el ensayo de titulación de niveles de transcripción descrito por Becker-André y Hahlbrock (9) con ligeras modificaciones. Alícuotas de 10 µl de RNA total fueron mezcladas con 10 µl de tampón concentrado dos veces de transcriptasa reversa (Boehringer Mannheim) conteniendo 0.8 mM de cada dNTP, 4 µM del cebador TG3 (comienza 43 nucleótidos después del codón de terminación del gen *ftsZ*) y una cantidad apropiada de cRNA competidor. Después de una incubación a 65°C durante 5 minutos se permitía el anillamiento del cebador a temperatura ambiente durante otros 5 minutos. Se añadían 7 unidades de inhibidor de RNAasa y 10 unidades de transcriptasa inversa M-MLV para permitir la síntesis de cDNA durante 60 minutos a 42°C. Posteriormente la transcriptasa era inactivada calentando a 95°C durante 5 minutos seguido de rápido enfriamiento en hielo.

La amplificación era llevada a cabo añadiendo 5 µl de cDNA a 50 µl de tampón de amplificación (Boehringer Mannheim) conteniendo 0.2 mM de cada dNTP, 0.25 µM de cada uno

de los cebadores (reverso y directo) y una unidad de *Taq* DNA polimerasa. En todos los ensayos el cebador MA8 fue usado como cebador reverso. MA8 solapa en 7 nucleótidos con TG3 con lo que se consigue una alta especificidad para los fragmentos esperados. Se usaron diferentes oligonucleótidos como cebadores directos. Los niveles totales de mRNA de *ftsZ* fueron ensayados con TG2 (ver figura 4). Los niveles de mRNA producidos por promotores distintos a los proximales fueron medidos con el cebador MA9. Finalmente los transcritos producidos desde los promotores del gen *ftsQ* se cuantificaron usando el cebador MA10. Después de una incubación de 1 minuto a 94°C las muestras fueron sometidas a 35 ciclos de amplificación (30 segundos a 94°C, 1 minuto a 66°C y 3 minutos a 72°C) seguidas por una incubación final de 72°C durante 8 minutos. La temperatura de anillamiento fue de 60°C para MA10 y el número de ciclos fue de 40 cuando se usaron MA9 o MA10 como cebadores directos. Los productos de reacción fueron analizados mediante geles en agarosa al 1% a 5 V/cm y posteriormente cuantificados por densitometría láser.

5. CLONAJE DE LOS GENES *ftsA* Y *ftsQ*.

En el clonaje del gen *ftsA*⁺ el DNA del plásmido pZAQ se cortó con *EcoRI*, aislándose el fragmento de 2.3 kb que contiene a dicho gen. Este fragmento fue introducido en el pEMBL18 cortado con la misma enzima. Se seleccionó la orientación opuesta al promotor *lac*, denominándose al plásmido pJPV181. Para los ensayos de complementación se reclonó tanto el alelo *ftsA*⁺ del pJPV181 como el alelo *ftsA101* presente en el plásmido pMSV1 (ver apartado 3). El fragmento de 2.2 kb *EcoRI*-*Bam*HI de ambos plásmidos, conteniendo cada alelo *ftsA*, se clonó en el plásmido pBR322 cortado con las mismas enzimas, obteniéndose los plásmidos pMSV5(*ftsA*⁺) y pMSV51(*ftsA101*). Ambos fueron introducidos en las estirpes D2 y D3, ambas *ftsA(ts)*, para los ensayos de complementación a 42°C. Posteriormente, para la mutagénesis dirigida por PCR, se construyó el plásmido pMSV20(*ftsA*⁺) por delección del fragmento *NdeI* de 2.3 kb del plásmido pMSV5. Con esta delección eliminábamos una serie de dianas de restricción que se presentaban duplicadas en el pMSV5 (figura 5).

Para el clonaje del gen *ftsQ*⁺ se construyó el plásmido pJPV1000 clonando el fragmento de 1.75 Kb *Pst*I-*Bgl*III que contenía el gen *ftsQ*⁺ del plásmido pZAQ en los sitios *Pst*I-*Bam*HI de pEMBL18. Para evitar problemas en los ensayos de complementación debidos a la presencia del promotor *lac* proveniente del pEMBL18, el fragmento de 1.8 kb *Pst*I-*Sma*I del pJPV1000 conteniendo el alelo *ftsQ*⁺ fue clonado en el plásmido pBR322 cortado con *Pst*I-*Ssp*I obteniéndose el plásmido pMSV6. Un proceso similar se realizó con los plásmidos pMSV2(*ftsQ11*) y pMSV3(*ftsQ12*) (ver apartado 3) para conseguir los plásmidos pMSV61 y 62 respectivamente. Estos tres plásmidos fueron introducidos en la estirpe KJB22(*ftsQ(ts)*) para comprobar su capacidad de complementación de la mutación a 42°C (figura 6).

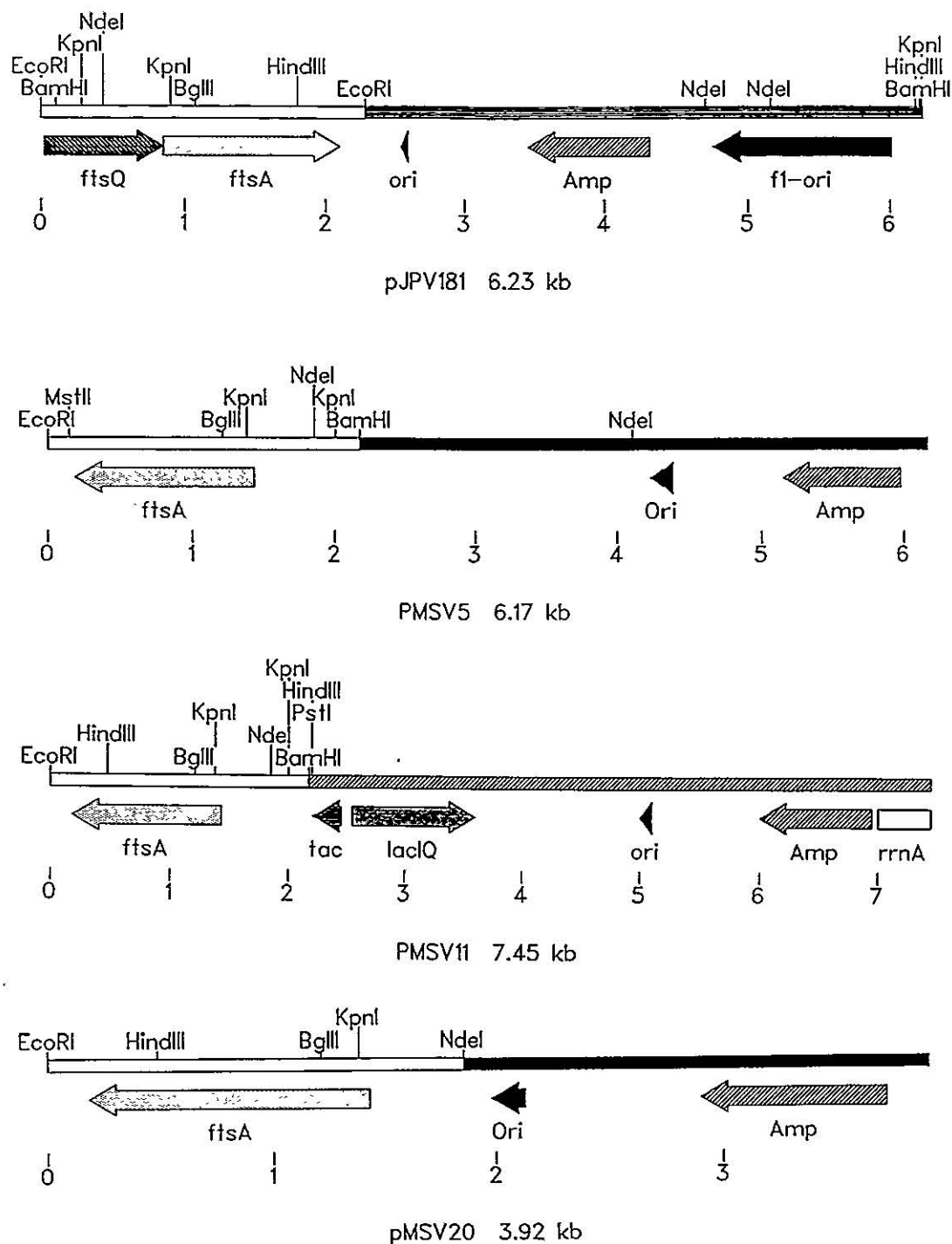


Figura 5: Plásmidos utilizados en el estudio de la proteína FtsA.

El plásmido pJPV181 contiene una copia completa del gen *ftsA* procedente del plásmido pZAQ y fue usado para la mutagénesis *in vitro* del gen. El plásmido pMSV5 contiene el gen *ftsA* clonado en pBR322 y fue usado en los estudios de complementación en mutantes *ftsA(ts)*. El plásmido pMSV11 contiene al gen *ftsA* bajo control del promotor *tac*. El plásmido pMSV20 proviene del plásmido pMSV5 tras delecionar el fragmento *NdeI*, y se usó para la mutagénesis *in vitro* con PCR (ver material y métodos para los detalles).

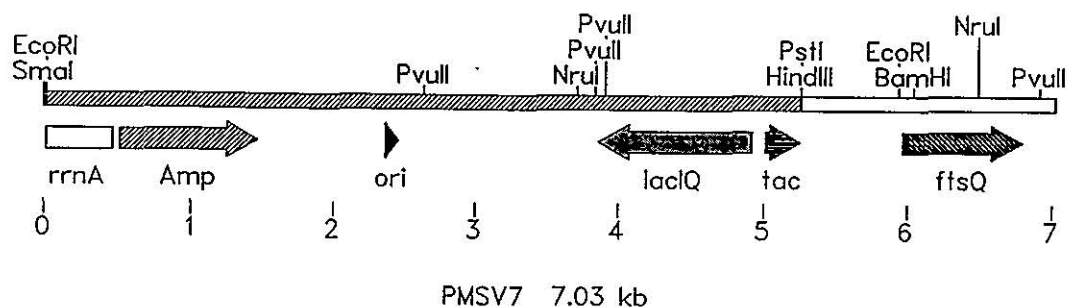
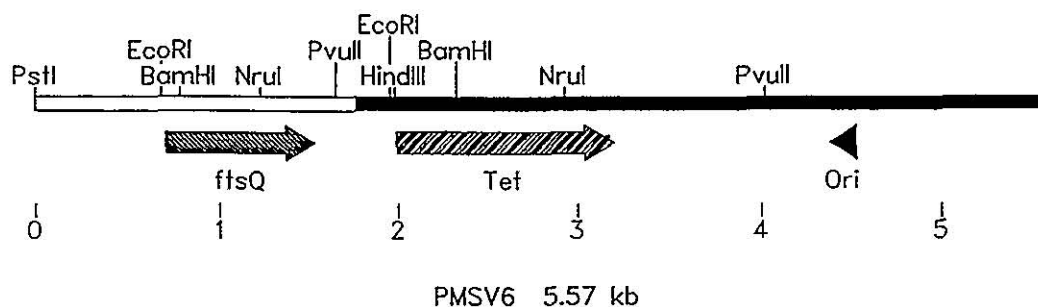
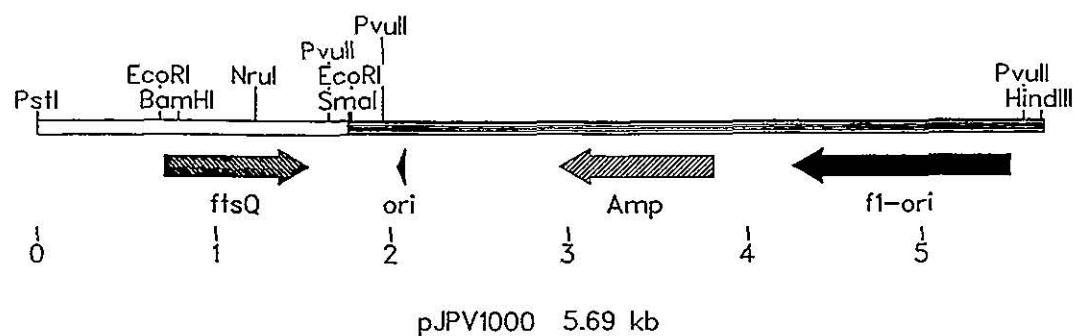


Figura 6: Plásmidos utilizados en el estudio de la proteína FtsQ.

El plásmido pJPV1000 contiene una copia completa del gen *ftsQ* procedente del plásmido pZAQ y se usó para la mutagénesis *in vitro* y para la construcción del mutante termonulo del gen *ftsQ* (ver fig. 7). El plásmido PMSV6 contiene el gen *ftsQ* clonado en pBR322 y fue usado en los estudios de complementación en un mutante *ftsQ(ts)*. El plásmido PMSV7 contiene al gen *ftsQ* bajo control del promotor *tac*, (ver material y métodos para los detalles).

6. CONSTRUCCION DE HIPERPRODUCTORES DE FtsA, FtsA101 Y FtsA102.

Los fragmentos *EcoRI-BamHI* de 2.2 kb de los plásmidos pMSV5 y pMSV51, que contienen a los alelos *ftsA*, fueron clonados en el plásmido pJF119HE cortado con las mismas enzimas, obteniéndose los plásmidos pMSV11(*ftsA*⁺) y pMSV12(*ftsA101*). El clonaje del alelo *ftsA102* bajo control del promotor *tac* se realizó por sustitución del fragmento de 1.3 kb *EcoRI-BglIII* del pMSV11 por el mismo fragmento proveniente del plásmido pMJV1(*ftsA102*). El plásmido resultante fue el pMJV20. Los plásmidos pMSV11, pMSV12 y pMJV20 fueron introducidos en MC1061 para obtener las estirpes VIP194, 195 y 240 (figura 5).

7. CONSTRUCCION DE HIPERPRODUCTORES DE FtsQ, FtsQ11 y FtsQ12.

Los fragmentos *SmaI-PstI* de 1.76 kb que contienen los diferentes alelos de *ftsQ* en los plásmidos pJPV1000, pMSV2 y pMSV3, (ver apartado 3) se clonaron en los sitios *SmaI-PstI* del pJF119HE dando lugar a los plásmidos pMSV7(*ftsQ*⁺), pMSV71(*ftsQ11*), y pMSV72(*ftsQ12*). Se transformó la estirpe MC1061 con estos plásmidos obteniéndose así las estirpes VIP147, VIP148 y VIP149 respectivamente. En estos plásmidos, cada alelo *ftsQ* está bajo control de *tacp* y *lacI^q* con lo que podemos hiperproducir cada proteína por adición de IPTG al medio (figura 6). La estirpe VIP226 se originó a partir de la transformación de MC1061 con el plásmido pJPV7 (cortesía de Jesus Pla). Este plásmido contiene al gen *ftsQ* bajo control del promotor P_R y *cl857*, por lo que la hiperproducción de FtsQ se induce a 42°C (ver más adelante).

8. CONSTRUCCION DE UN MUTANTE TERMONULO PARA EL GEN *ftsQ*

En la construcción de un mutante termonulo para el gen *ftsQ* se siguió el procedimiento diseñado por Hamilton *et al.* (38). En esta construcción la copia cromosómica del gen *ftsQ* es alterada reemplazando gran parte de la secuencia codificante por un gen que codifica para resistencia a kanamicina. Mientras, una copia completa del gen *ftsQ* es provista en *trans* bajo el control de un replicón termosensible. Los plásmidos usados para la obtención del mutante se muestran en la figura 7.

Para obtener una delección en *ftsQ*, el fragmento interno *BamHI-NruI* de 0.45 kb del gen *ftsQ*⁺ contenido en pJPV1000 fue sustituido por el fragmento *PstI* de 1.4 kb del plásmido pUC4K, (79) que contiene la resistencia a kanamicina. El plásmido así obtenido, denominado

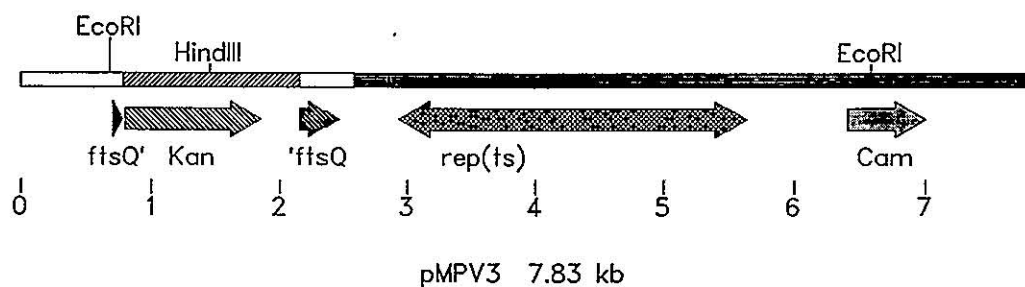
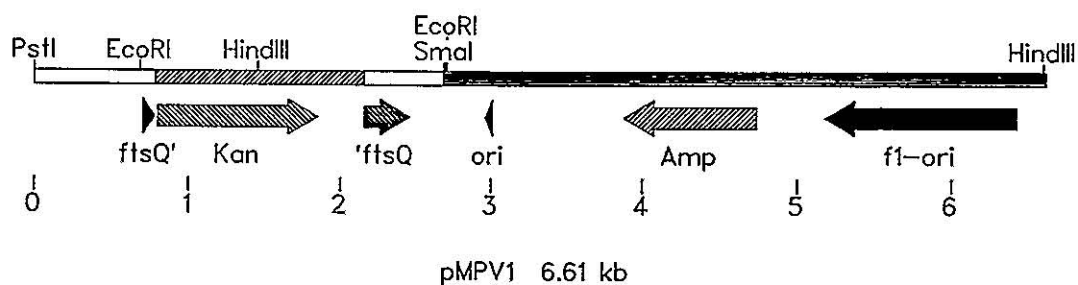


Figura 7: Plásmidos diseñados para obtener el mutante termonulo *ftsQ*.

El plásmido pMPV1 fue obtenido después de haber reemplazado parte del gen *ftsQ* en pJPV1000 por la resistencia a kanamicina proveniente del pUC4K. Esta construcción fue transferida al plásmido termosensible pMAK700, para obtener el plásmido pMPV3, el cual fue usado para el reemplazamiento genético, (ver material y métodos).

pMPV1, no es capaz de complementar a la estirpe KJB22. Finalmente, el fragmento *Pst*I-*Pvu*II de 2.6 kb del plásmido pMPV1 conteniendo la copia alterada de *ftsQ* se clonó en el fragmento *Bam*HI-*Hind*III de 5.26 kb del plásmido pMAK700, el vector termosensible, para obtener el plásmido pMPV3.

Para conseguir la inserción cromosómica del pMPV3 se transformó la estirpe MC1061. Los transformantes fueron crecidos a 42°C en placas de LB con cloranfenicol y kanamicina. Las colonias que crecieron fueron resemebradas en el mismo medio pero a 30°C para provocar la excisión del plásmido. La mayor parte de estas excisiones conduce a la recuperación del plásmido pMPV3, volviéndose a la situación de partida. Sólo en una pequeña parte la copia cromosómica *ftsQ*⁺ es la que sale con el plásmido, permaneciendo en el cromosoma la copia delecionada del gen *ftsQ* conteniendo la resistencia a kanamicina. Para discriminar en que colonias había ocurrido esto último, se vuelven a resemebrar en medio LB y LB con kanamicina, y se cultivan a 42°C. Aquellas que no crezcan en ninguna de las dos condiciones serán los mutantes termonulos.

Para confirmar que había tenido lugar el reemplazamiento génico, se aisló DNA plasmídico de estas colonias comprobándose por análisis de restricción que los plásmidos contenían ahora la copia *ftsQ*⁺. La estirpe así obtenida fue denominada VIP210 y el plásmido resultante pMPV4.

9. OBTENCION DE FRACCIONES CELULARES.

Los cultivos de células se dejaban crecer hasta la D.O. deseada en cada experimento. Entonces se recogía por centrifugación y se lavaban con PBS pH 7.8 (tampón fosfato-salino) (3). Posteriormente se obtenían esferoplastos según el protocolo de Osborn *et al.* (55) La obtención de fracciones de membrana total y la separación de membrana interna y externa fue realizada siguiendo el método descrito por Boyd y Holland (15).

Para la hiperproducción y purificación de la proteína Cro-FtsZ se usó una estirpe que contenía el plásmido pJPVZ, tal y como se describe en Pla *et al.* 1990 (58). En el caso de FtsQ se siguió el mismo procedimiento para su hiperproducción en la estirpe VIP226.

10. TECNICAS ELECTROFORETICAS

10.1. Electroforesis de DNA

Para las electroforesis de DNA en geles de agarosa se prepararon geles horizontales de agarosa a una concentración final del 0.8%.

En la secuenciación de DNA los geles de acrilamida utilizados se prepararon al 6% según se indica en el *kit* de "sequenase v 2.0" de USB.

10.2. Electroforesis de proteínas

10.2.1. Electroforesis de proteínas unidimensional.

Para la resolución electroforética de proteínas, se siguió el método de electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) descrito por Laemmli & Favre (45). Los geles se tiñeron usando azul de Coomassie o nitrato de plata. Las muestras para SDS-PAGE se hirvieron durante 5 minutos en Tris 20 mM pH 7.8, SDS 1% (p/v), β -mercaptoetanol 0.14 M. A continuación se centrifugaron (10.000xg, 5 min., 20°C) para eliminar los restos no solubles (DNA y mureína principalmente) y al sobrenadante se añadió 1/5 del volumen de una solución de glicerol 50 % (v/v) y azul de bromofenol 0.01% (p/v), tras lo cual se cargaron en un gel al 12% de acrilamida. Las cantidades usadas se indican en cada caso.

10.2.2. Electroforesis de proteínas bidimensional.

Las muestras de proteína eran precipitadas con acetona y posteriormente resuspendidas en un tampón conteniendo 9M de urea tal y como se describe en O'Farrell (56). Primeramente se separaba a las proteínas por su carga mediante isoelectroenfoque (IEF) llevado a equilibrio con la siguiente mezcla de anfólitos: 1,6% pH 5-7 y 0,4% pH 3-10. Posteriormente se separaban por tamaños en un SDS-PAGE al 12,5%, según O'Farrell. Los geles se tiñieron con azul de Coomassie o transferidos a membrana.

11. TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A MEMBRANA

Las proteínas separadas en SDS-PAGE se transfirieron a membranas "Immobilon" (Millipore) según describe Towbin *et al.*(76) Posteriormente se tiñeron de manera reversible con rojo Ponceau (Sigma), para comprobar tanto la calidad de la transferencia como la posición relativa de las distintas proteínas en el caso de los geles 2D.

12. DETECCION INMUNOLOGICA DE LAS PROTEINAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA

Las membranas fueron incubadas con antisueros policlonales de conejo inmunizados contra una determinada proteína de *E. coli* (Tabla 3). Para la detección se utilizó rutinariamente el conjugado proteína A-peroxidasa (Sigma) y diaminobenzidina (DAB) o 4-cloro-1-naftol como sustrato. También se usó el conjugado de anticuerpos anti-IgG-fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) y como sustratos 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP) y cloruro de 4-nitro azul tetrazolium (NBT), para revelar la membrana de la figura 16c. En el caso de la detección de la proteína FtsQ se usó el *kit* de proteína A-oro de Biorad. Para cuantificar el contenido celular de proteína FtsZ, se analizaron por inmunotransferencia seguida de incubación con antisuero MVJ-9, diferentes cantidades de la proteína de fusión Cro-FtsZ y extractos celulares de las estirpes MC1061 y W3110 correspondientes a un número de células conocido. Los niveles celulares de la proteína FtsZ en la estirpe VIP205 fueron referidos a los niveles de la proteína EF-Tu medidos en la misma membrana con anticuerpos MVJ-4. La cuantificación de las bandas se realizó por densitometría sobre las propias membranas.

13. MARCAJE RADIATIVO DE PROTEINAS

Cultivos de MC1061 se crecieron en medio M9 a 37°C hasta una D.O.₅₄₀ = 0.1. En ese momento se añadió L-[³⁵S]Metionina (1Ci/mmol) hasta una concentración final de 10 µM. A los cinco minutos se añadió metionina hasta una concentración de 2 µgr/ml recogiendo muestras a distintos intervalos para su análisis posterior.

Para el marcaje de proteínas con fósforo radiactivo se crecieron las células en medio B, medio muy pobre en contenido de fósforo. El [³²P]ortofosfato sódico (10mCi/ml) se añadió a la concentración de 40 µCi/ml de cultivo. El marcaje duró treinta minutos y se procesaron las muestras tal como se describe en Cortay *et al.*(20)

14. INMUNOPRECIPITACION DE FtsZ

Un volumen de 0.5 ml de células de MC1061 marcadas con L-[³⁵S]Metionina se mezclaron con 0.6 unidades de D.O.₅₄₀ de un cultivo de MC1061 no marcado. La mezcla fue incubada en hielo y tratada con el mismo volumen de TCA al 10% frío. Después de centrifugar a 4°C durante 10 min. a 10.000 rpm en una minifuga, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavo con acetona fría. Después de secar, el precipitado se resuspendió en 50 µl de tampón 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0.5% SDS y se hirvió durante 3 minutos. Tras ello se añadió 450 µl de tampón KI (50 mM Tris pH 8, 75 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA) y se realizó un

pulso de centrifugación. Se recogió el sobrenadante y se añadió 40 µl de antisuero MVJ9 (anti-FtsZ) incubándose durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se trató con 80 µl proteína A-agarosa y tras incubación durante 2 horas a 4°C se precipitó por centrifugación. El precipitado fue tratado para su análisis mediante SDS-PAGE, seguido de una transferencia a membrana. Esta fue tratada con el suero policlonal MVJ-9 y revelada mediante Proteína A-peroxidasa y DAB. Posteriormente se realizó una autorradiografía de la membrana. Sobre ambas se realizaron densitogramas. El densitograma de la membrana nos da una idea del rendimiento de la inmunoprecipitación, por lo que se relativizó el densitograma de la autorradiografía al densitograma de la inmunotransferencia.

15. PREADSORCIÓN DE LOS SUEROS POLICLONALES.

Para evitar problemas de uniones inespecíficas los sueros fueron preadsorbidos con extractos de estirpes que no contenían la proteína que iba a ser reconocida. Para los sueros MVJ-4 (antiFtsZ) y MVJ-11 (antiFtsQ) se usaron los mutantes *termonulos* VIP2 y VIP204 respectivamente. Para la preadsorción de MVJ-2 (antiFtsA) se usó la estirpe OV16 que contiene la mutación *ftsA(amb)* en un fondo *sup(ts)*.

La estirpe que iba a ser usada para la preadsorción se cultivaba a 30°C hasta una D.O.₆₀₀=0.1, momento en el cual se pasaba a 42°C durante 2 horas. Al cabo de ese tiempo se recogieron las células y se resuspendieron en PBS en una concentración de 50 unidades D.O. por ml. Fueron distribuidas en fracciones de 1 ml. y cada fracción fue tratada con 20 mg. de lisozima a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se realizó la rotura de las células mediante ocho pulsos de 30 segundos en un sonicador. Finalmente se añadió DNasa y RNasa a una concentración de 100 µg/ml y se incubó a 4°C durante una hora. Se preadsorbieron 200 µl de antisuero con 50 unidades D.O.₆₀₀ tratadas con formaldehído al 3%, siguiendo el protocolo de Sherman y Goldberg (68). El antisuero así tratado era almacenado a -20°C.

Para comprobar la limpieza del suero se realizaba una prueba sobre un extracto de la estirpe que había sido usada para la preadsorción. Los extractos de VIP2 y VIP204 fueron analizados por SDS-PAGE y el de OV16 por medio de una electroforesis bidimensional. Posteriormente se realizaba la transferencia de los geles a una membrana para ser tratado con el antisuero preadsorbido y revelado con el sistema proteína A-peroxidasa y DAB. En todos los casos las membranas permanecieron incoloras.

16. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN ATP-AGAROSA.

Se siguió fundamentalmente el protocolo descrito para DnaK por Mc Carthy (49). Después de hiperproducir FtsA o FtsA102, y fraccionar el cultivo, la fracción soluble era tratada con sulfato amónico hasta un 30% de saturación en el caso de FtsA, y hasta un 45% en el caso de FtsA102, a 4°C. El precipitado obtenido era resuspendido en tampón imidazol (Imidazol 20 mM, acetato magnésico 5mM, β -mercaptoetanol 5 mM, cloruro potásico 50 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8) y dializado frente a 700 volúmenes del mismo tampón. Tanto la AMP-agarosa como la ATP-agarosa eran hidratadas en 10 volúmenes del mismo tampón. Se usaron columnas de 1 ml de volumen. El volumen de la muestra fue de 250 μ l. Los tratamientos de la muestra previos a su incubación en la columna se explican en el texto. Para fraccionar la proteína FtsA unida a la membrana, se trataba la fracción de membrana con tampón imidazol con 0.5% de Triton X-100 y posteriormente se centrifugaba a 20.000xg durante una hora. Posteriormente se recogía el sobrenadante que se dializaba para eliminar el detergente. Tras la diálisis, la muestra que contenía a FtsA se dejaba incubar con la columna a 4°C durante 2 horas. Pasado ese tiempo se lavaba la columna con 2 ml de tampón imidazol, 2 ml de tampón imidazol con 1 M de cloruro potásico, 2 ml de tampón imidazol y finalmente 2 ml de tampón imidazol con 5 mM de ATP. Se recogieron fracciones en todos los lavados y de la matriz cromatográfica para ser analizadas por SDS-PAGE e inmunotransferencia.

RESULTADOS

1. LA PROTEÍNA FtsA PRESENTA UNA CAPACIDAD DE UNIÓN A ATP QUE ESTÁ RELACIONADA CON EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN Y CON SU LOCALIZACIÓN CELULAR

FtsA ha sido descrita como una proteína que forma parte estructural del septo (75) coordinando la replicación del DNA y la división de una forma independiente a la que realiza la proteína FtsZ (72). Aunque su nivel celular es bajo, unas 150 moléculas por célula (82), es una proteína esencial para la vida de la célula. La existencia de un mutante en el gen *ftsA* que afecta a la actividad de la proteína PBP3 (71), responsable de la síntesis del peptidoglicano septal, permite postular para FtsA un posible papel en la regulación de las últimas etapas de la división celular.

1.1 LA PROTEÍNA FtsA SE LOCALIZA EN LA MEMBRANA Y EN EL CITOPLASMA.

La disponibilidad de anticuerpos policlonales específicos contra la proteína FtsA, nos ha permitido estudiar su localización en la célula. Debido al bajo nivel celular de la proteína antes mencionado, los primeros intentos de localización se realizaron con estirpes hiperproductoras de la proteína. Se había descrito que la hiperproducción de FtsA en estirpes que contenían el gen *ftsA* bajo el control del promotor P_R regulable por temperatura mediante el alelo *cI857* del represor del fago λ , la proteína se localizaba fundamentalmente en las fracciones de membrana (57). Sin embargo la alta expresión debida a este tipo de promotores causaba la acumulación de un gran número de cuerpos de inclusión formados por agregados de proteína. Este fenómeno, junto con el hecho de que las bacterias han de ser sometidas a un choque térmico, podría causar alteraciones en la localización de la proteína.

Para evitar la formación de estos cuerpos de inclusión y el estrés producido por el choque térmico, se utilizó una estirpe en la que el gen *ftsA* se encontraba bajo el control del promotor *tac* dependiente de IPTG. En esta estirpe, cuando FtsA es hiperproducida por períodos breves de tiempo, se localiza a la proteína tanto en la fracción de membrana como en la fracción soluble (Figura 8). Para eliminar la posibilidad de contaminación entre las fracciones primeramente sometimos a las fracciones de membrana a distintas condiciones de extracción con fuerza iónica creciente y extracción usando diversos detergentes (Figura 8a). Se observó que la proteína FtsA asociada a la membrana es fácilmente liberada con concentraciones bajas de detergentes pero no por aumento de la fuerza iónica. Es de notar la aparición de una banda de alrededor de unos 30 kDa que también es reconocida por el antisuero y que aparece fundamentalmente en la fracción de membrana. Pensamos que esta banda se debe a la degradación de FtsA ya que no es detectada ni en una estirpe salvaje ni en la estirpe mutante OV16 *ftsA(am)* cuando se crece a 42°C.

Figura 8: Localización celular de FtsA cuando es hiperproducida.

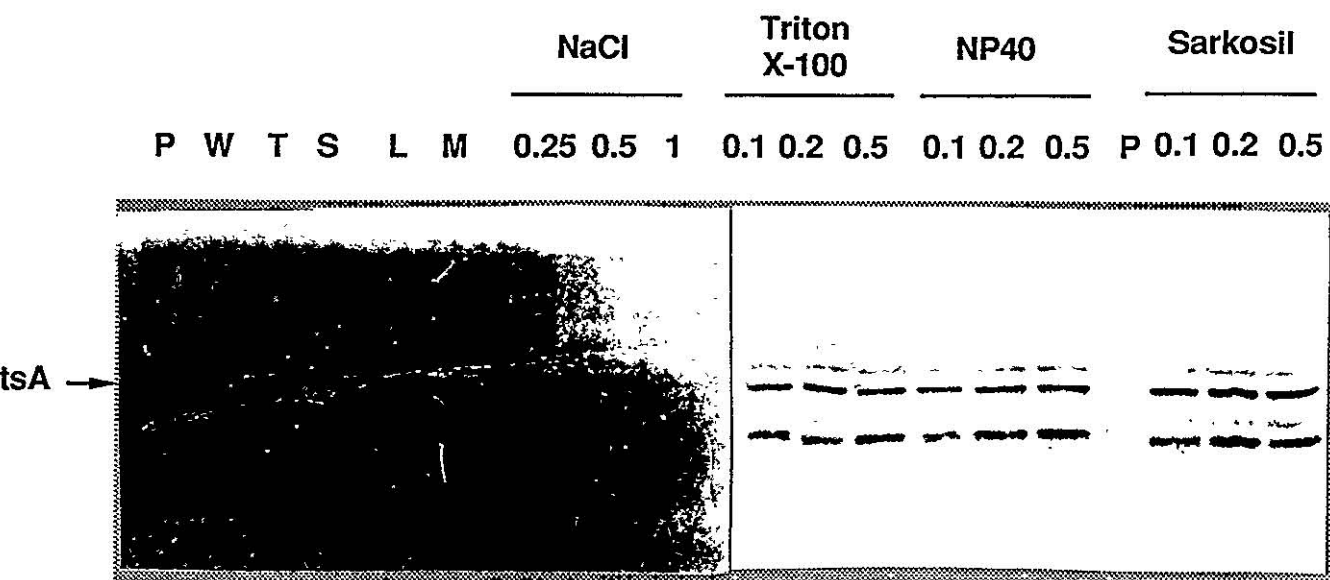
A: Se creció un cultivo de la estirpe VIP194 en presencia de 1 mM de IPTG durante 15 minutos. Se separó la fracción soluble y la fracción de membrana (carriles S y M). Esta última se lavó con PBS para eliminar restos de la fracción soluble (carril L) y luego fue resuspendida en el mismo tampón. Después de repartir la fracción de membrana en alícuotas, cada una se trató con diferentes productos para solubilizar FtsA. Tras una incubación de 1 hora a 4°C se centrifugaron las muestras y se recogió el sobrenadante. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE seguido de una inmunotransferencia. En cada carril se cargó material equivalente a 0.5 unidades de DO₆₀₀ excepto el carril L que lleva el equivalente a 2 unidades.

Carril P:	Patrones de peso molecular.	
Carril W:	MC1061, proteína total.	
Carril T:	VIP194, proteína total.	
Carril S:	VIP194, fracción soluble.	
Carril L:	VIP194, lavado de la fracción de membrana.	
Carril M:	VIP194, fracción total de membrana.	
Tratamiento con ClNa	Carril 0.25:	0.25 M de ClNa.
	Carril 0.5:	de ClNa.
	Carril 1:	tratamiento con 1 M de ClNa.
Tratamiento con Triton	Carril 0.1:	0.1 % de Triton X-100.
	Carril 0.2:	0.2 % de Triton X-100.
	Carril 0.5:	0.5 % de Triton X-100.
Tratamiento con NP-40	Carril 0.1:	0.1 % de Np40.
	Carril 0.2:	0.2 % de Np40.
	Carril 0.5:	0.5 % de Np40.
Carril P:	Patrones de peso molecular.	
Tratamiento con Sarkosil	Carril 0.1:	0.1 % de Sarkosil.
	Carril 0.2:	0.2 % de Sarkosil.
	Carril 0.5:	0.5 % de Sarkosil.

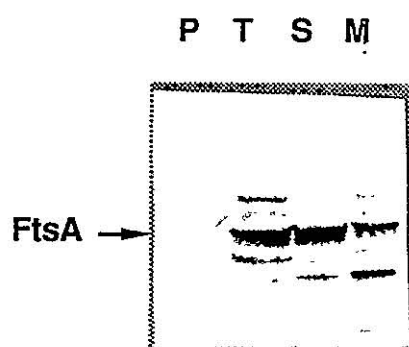
B: Localización de FtsA en la fracción soluble cuando es hiperproducida Se creció un cultivo de la estirpe VIP194 en presencia de 1 mM de IPTG durante 15 minutos. Se fraccionaron las células según se describe en material y métodos con la salvedad de que la ultracentrifugación fue de 15 horas para tener una completa separación de las membranas. El análisis de las muestras se realizó por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia. En cada carril se cargó material correspondiente a 0.5 unidades de DO₆₀₀.

Carril P:	Patrones de peso molecular.
Carril T:	Proteína total de VIP 194.
Carril S:	Fracción soluble.
Carril M:	Fracción de membrana.

A



B



En el caso de la fracción soluble realizamos una ultracentrifugación de 15 horas para sedimentar todos los posibles restos de membrana. A pesar de este tratamiento, seguimos encontrando a FtsA en el sobrenadante (Figura 8b).

1.2. EN LA CELULA EXISTEN DOS FORMAS DE FtsA EN LOCALIZACIONES DISTINTAS

La descripción de una homología para la proteína FtsA con las kinasas de ciclo celular de levaduras (63) (figura 9) predecía la existencia de posibles sitios de fosforilación dentro de la molécula de FtsA. Debido a que FtsA es una proteína relativamente poco abundante en la célula, su localización en condiciones fisiológicas presentaba el inconveniente del manejo de grandes cantidades de proteína total. Al mismo tiempo, si FtsA se encontraba fosforilada en la célula mostraría diferencias de punto isoeléctrico. Por ello, el análisis de las fracciones se realizó por la técnica de electroforesis bidimensional, desarrollada por O'Farrell (56), seguida de transferencia a membrana e inmunotinción con anticuerpos policlonales anti-FtsA. Al analizar mediante esta técnica un extracto total de la estirpe MC1061, comprobamos que FtsA presentaba dos formas de idéntico peso molecular pero distinto punto isoeléctrico (Figura 10a). La presencia de dos formas de FtsA con diferente punto isoeléctrico puede indicar que esta proteína es susceptible de alguna modificación de tipo covalente tal como es una fosforilación. Para abordar esta cuestión los extractos totales de MC1061 fueron tratados con fosfatasa alcalina previamente a su análisis por geles 2D tal como describieron Amster y colaboradores (2). En la figura 10b se observa que la muestra tratada con fosfatasa alcalina sólo presenta la proteína de punto isoeléctrico más alto, tal como se esperaría si desapareciese la forma fosforilada.

Otro abordaje paralelo se realizó mediante un marcaje de proteínas con fósforo inorgánico (20) de una estirpe hiperproductora de FtsA y de la estirpe parental conteniendo el plásmido vector. En los geles bidimensionales (Figura 11) se observa en la tinción de proteínas la aparición de una serie de manchas en la estirpe hiperproductora de FtsA en la misma zona donde se localiza a FtsA con el antisuero. La autorradiografía de estos geles nos muestra la aparición de una mancha radiactiva en la misma zona.

El análisis mediante geles 2D e inmunotransferencia de las fracciones de membrana y de citoplasma de la estirpe MC1061 confirmó, como esperábamos por los resultados de los experimentos anteriores, que FtsA se encontraba presente en ambas fracciones (figura 12). Sin embargo en la fracción soluble se encontraron las dos formas de FtsA mientras que la fracción de membrana sólo se encontró la forma con el punto isoeléctrico más alto.

Figura 9: Homología postulada de FtsA con cdc2 y cdc28.

Comparación de la secuencia péptidica de FtsA (residuos 305-357) con la proteína cdc28 de *Saccharomyces cerevisiae* (residuos 84-138) y con la proteína cdc2 de *Schizosaccharomyces pombe* (residuos 80-136) (63). Los aminoácidos idénticos entre FtsA y una o las dos proteínas están en negrita. En la parte superior se representa un esquema de la molécula de FtsA, en la que la zona sombreada se corresponde con la región de homología. También se presenta la posición del par tirosina-treonina (221-222) propuesto como sitio de fosforilación y que en la proteína mutante FtsA102 está cambiado a fenilalanina-alanina.

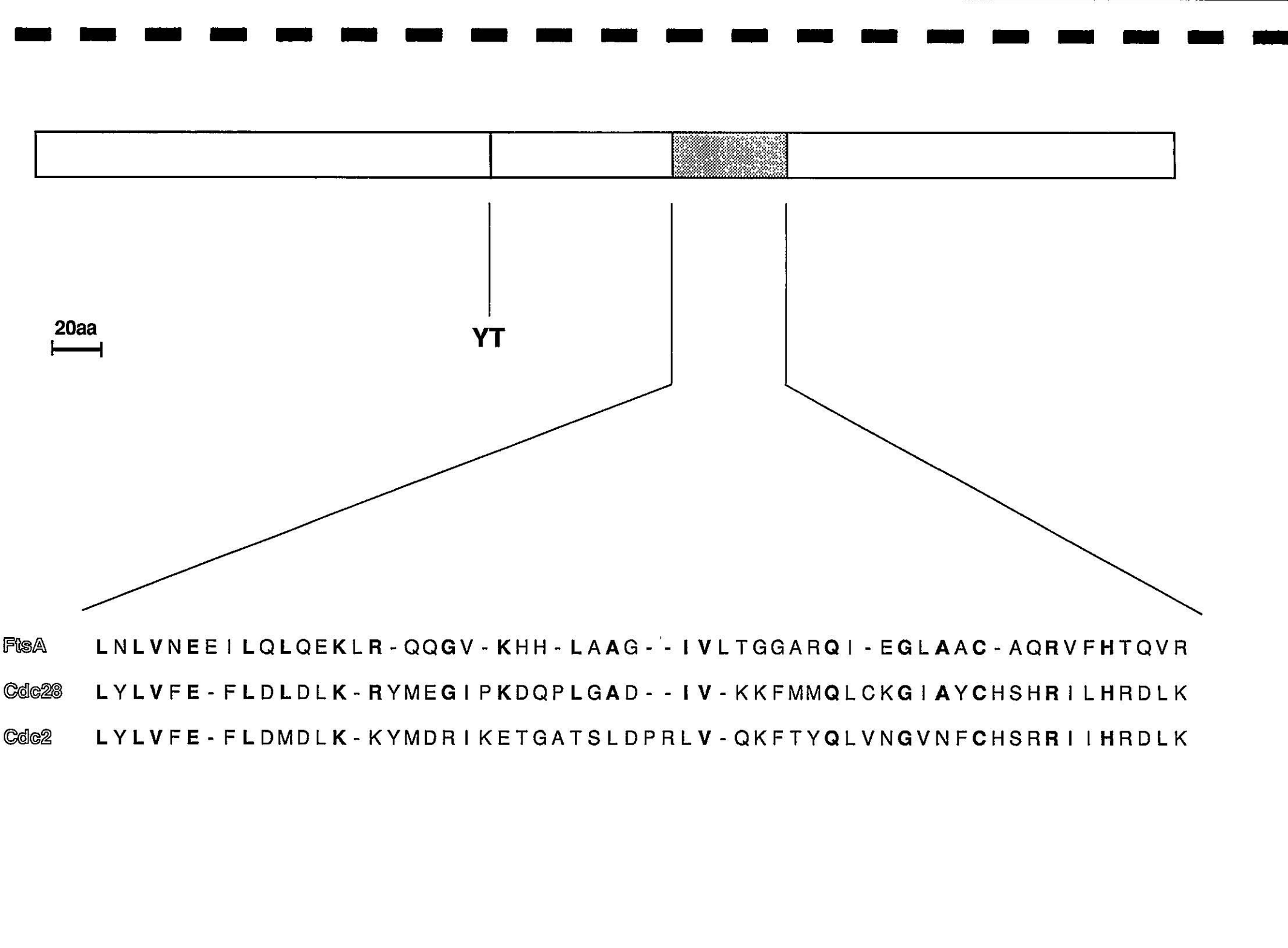


Figura 10: Localización de FtsA en geles bidimensionales.

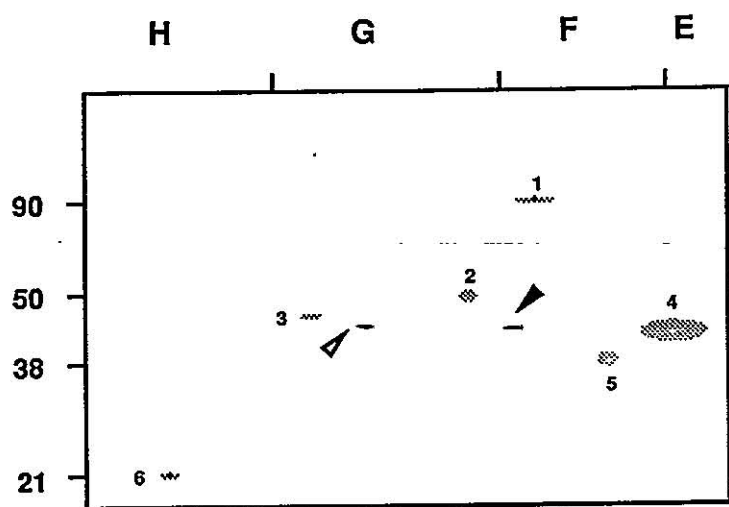
Inmunotransferencias de electroforesis bidimensionales realizados según la técnica de O'Farrell de un extracto total de MC1061 correspondiente a 3 unidades de DO_{600} . Previamente al tratamiento con anticuerpos la membrana de inmunotransferencia se tiñó con rojo Ponceau para determinar el patrón de proteínas de acuerdo al mapa de Neihdhart (59). Posteriormente fueron incubados con antisuero anti-FtsA MVJ-2 preadsorbido con extracto de OV-16 y revelados mediante proteína A-peroxidasa y DAB (Ver material y métodos).

A: Extracto de MC1061 sin tratar con fosfatasa alcalina.

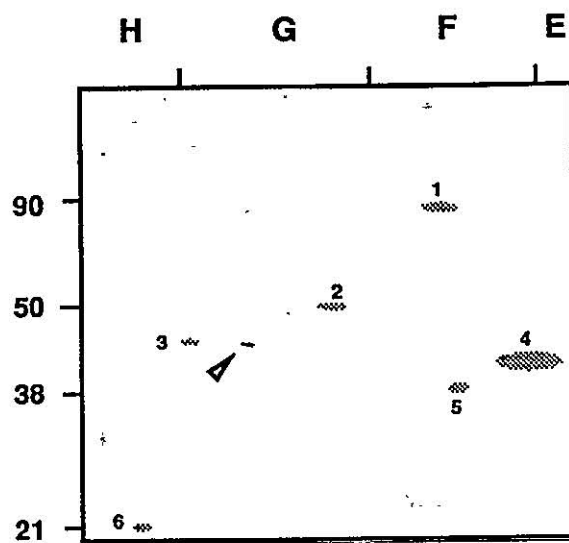
B: Extracto de MC1061 tratado con fosfatasa alcalina.

A la izquierda se han señalado los pesos moleculares. En la parte superior se han delimitado las zonas de diferente pH según el mapa de Neihdhart. Las diferentes proteínas nominadas se han localizado atendiendo a ese mapa. La flecha blanca indica la forma no fosforilada (más básica) y la flecha negra la fosforilada.

A

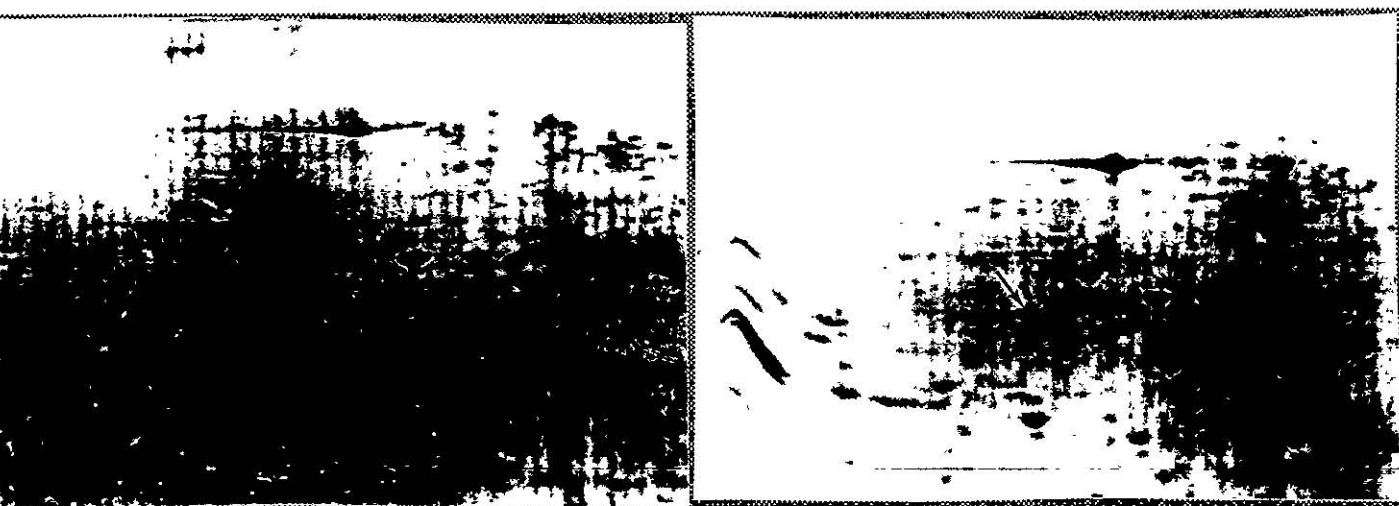


B



1: Phosphoenolpyruvate carboxylase
2: Adenosine-triphosphatase subunit α
3: W-protein

4: EF-Tu
5: RimL
6: Ribosomal release factor



I

II



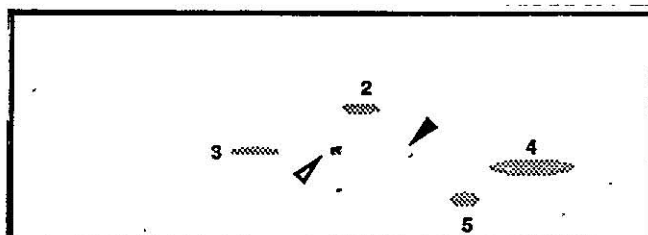
Figura 11: Patrón de proteínas fosforiladas en presencia y ausencia de un exceso de proteína FtsA.

Las estirpes VIP146 y VIP194 fueron crecidas en un medio mínimo con bajo contenido en fosfato. Después de crecer ambas estirpes en presencia de 1 mM de IPTG se añadió [32 P]ortofosfato sódico y se procedió tal como se indica en materiales y métodos. Los extractos de ambas estirpes correspondientes a 2 unidades DO₆₀₀, se analizaron por medio de electroforesis bidimensional.

A: Tinción con Coomassie de los geles bidimensionales. I- estirpe VIP146. II- Estirpe VIP194. La flecha señala la aparición de una nueva proteína.

B: Autorradiografías de los geles anteriormente mostrados. I- estirpe VIP146. II- Estirpe VIP194. La flecha señala la posición de la nueva proteína señalada en A. La mancha de fosforilación está desplazada hacia el lado más ácido.

A



B

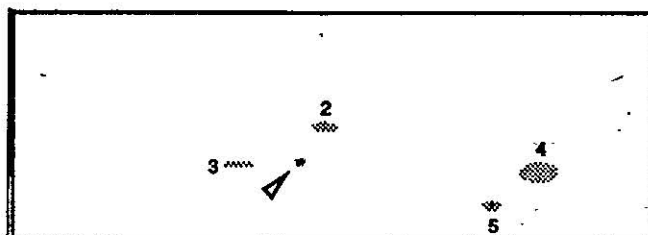


Figura 12: Fosforilación y localización de FtsA en la célula.

Un extracto de la estirpe MC1061 correspondiente a 3 unidades de DO_{600} fue fraccionado en proteínas solubles y proteínas de membrana tal y como se describe en materiales y métodos. Ambas fracciones fueron analizadas como en la figura 12. La fracción que contenía las proteínas de membrana fue mezclada con 0.5 unidades de DO_{600} de fracción de proteínas totales de MC1061 para poder determinar el patrón de proteínas por medio de la tinción con rojo Ponceau. Las proteínas de referencia son las mismas que la figura 12. Se indica también la posición de la forma fosforilada (flecha negra) y la no fosforilada (flecha blanca).

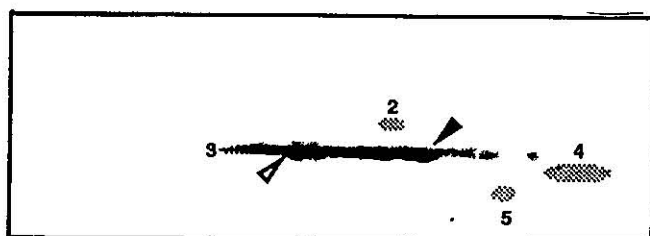
A: Proteínas de la fracción soluble.

B: Proteínas de la fracción de membrana.

De estos resultados puede concluirse que FtsA es susceptible de una modificación covalente de tipo fosforilación y que la misma está relacionada con la localización celular de la proteína. Este resultado puede interpretarse como un mecanismo de control de la actividad de FtsA, quizás de una forma similar a la mencionada por Robinson por la homología entre FtsA y la proteína de levaduras cdc2 (62). Hemos indicado antes que esta homología permitía postular la existencia de sitios de fosforilación dentro de FtsA. Uno de estos sitios sería el par de aminoácidos tirosina-treonina (221-222) (Figura 9). Mediante mutagénesis dirigida *in vitro* fueron cambiados a fenilalanina y alanina respectivamente. La proteína mutante así obtenida se denominó FtsA101. Comprobamos que esta proteína era incapaz de complementar a las estirpes mutantes D2 y D3 cuando era clonada en pBR322, al contrario de lo que sucede si se clona el alelo silvestre *ftsA*⁺. Al analizar la producción de proteína en geles, observamos que la hiperproducción de FtsA101 era mucho menor que la hiperproducción de FtsA para la misma cantidad de células.

Para comprobar si el par tirosina-treonina (221-222) era un sitio de fosforilación para FtsA se analizaron mediante geles 2D seguidos de inmunotransferencia, extractos de estirpes hiperproductoras tanto de FtsA como de FtsA101. En la figura 13 se muestra el resultado de estos geles. Aunque no aparecen dos isoformas bien delimitadas, sino más bien una serie de ellas formando un rastro continuo a lo largo de distintos puntos isoeléctricos, no se aprecia ninguna diferencia importante entre ambas muestras. Esto indica que quizás el par de aminoácidos propuesto por Robinson no esté involucrado directamente en la fosforilación de FtsA pero no excluye la posibilidad de que este cambio produzca un efecto negativo sobre otro residuo que sea el blanco de la fosforilación. Asimismo, la homología de FtsA con kinasas de levadura ha sido criticada por el hecho de que el dominio homólogo en FtsA está situado hacia el extremo C-terminal, mientras que en las proteínas de levaduras está más próximo al extremo N-terminal (14). Además, la proteína FtsA de *Bacillus subtilis*, que presenta un 30% de homología con FtsA (7), no presenta esa homología con las proteínas de levaduras.

A



B

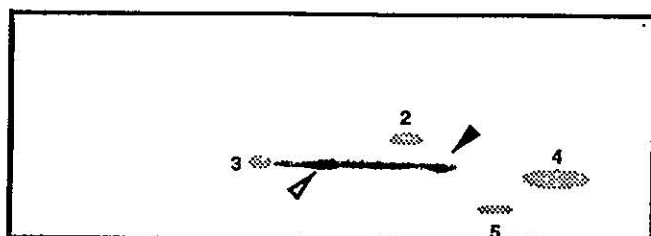


Figura 13: Hiperproducción de FtsA y FtsA101.

Las estirpes VIP194 y VIP195 fueron crecidas en medio rico en presencia de 1mM de IPTG. Extractos de ambas estirpes correspondientes a 2 unidades DO_{600} fueron tratados para su análisis por medio de geles bidimensionales seguidos de inmunotransferencia tal y como se describe en materiales y métodos. Las proteínas de referencia son las mismas que las de la figura 12. Se señala también la probable posición de la forma fosforilada (flecha blanca) y no fosforilada de FtsA (flecha negra) teniendo a los anteriores resultados.

: Estirpe VIP194.

: Estirpe VIP195.

1.3. LA PROTEÍNA FtsA TIENE CAPACIDAD DE UNIÓN A ATP DEPENDIENTE DEL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA.

La homología descrita por Arthur Robinson no es la única que se conoce para FtsA. Chris Sander y colaboradores (14) han descrito una nueva familia de proteínas que tienen un dominio de unión de ATP (figura 14). Este dominio se encuentra en actina, hexoquinasa, proteínas producidas por choque térmico (*Heat-shock protein*) tanto eucariotas, Hsp70, como procariotas, DnaK, y en proteínas procariotas de ciclo celular, entre ellas FtsA. En la tabla 5 se enumeran los mutantes condicionales descritos para el gen *ftsA* y en la figura 15 su posición dentro de la proteína. Es de destacar el hecho de que muchas de las mutaciones caen dentro de los dominios descritos por Sanders que se suponen son importantes para la función de FtsA. Paralelamente, algunas de estas mutaciones tienen su equivalente en DnaK, un miembro de esta familia de proteínas que unen ATP.

Basándonos en el hecho de que DnaK se une a columnas de ATP-agarosa (49) se diseñaron experimentos de cromatografía de afinidad en esa misma matriz para comprobar si FtsA también comparte la misma propiedad. Encontramos que FtsA necesita una incubación mucho más larga que DnaK para detectar su unión a ATP-agarosa, 90 minutos en lugar de 10. También comprobamos que al contrario de DnaK que es eluida de la columna cuando se lava con tampón conteniendo 5 mM de ATP, FtsA permanece retenida por la columna (Figura 16a). Para excluir que FtsA se uniese a la matriz y no al nucleótido se realizaron dos tipos de controles. En el primero, se preincubaba la muestra con 5mM de ATP previamente a su paso por la columna de ATP agarosa (Figura 16b) no observándose unión de FtsA a la columna. En el segundo, se pasó una muestra con FtsA por una columna de ATP-agarosa y por otra de AMP-agarosa, comprobándose que FtsA se une preferentemente a la primera (figura 16c). Todos los experimentos de unión a ATP-agarosa antes mencionados se realizaron con proteína FtsA procedente de la fracción citoplasmática. Al coexistir en esta fracción dos isoformas de FtsA sospechamos que la capacidad de unión a ATP pudiera estar relacionada con el estado de fosforilación de la proteína. Para discriminar cual de las dos formas presentaba la capacidad de unión a ATP la muestra que contenía a FtsA se trató previamente en una columna con fosfatasa alcalina inmovilizada y posteriormente se procedió a realizar una cromatografía de afinidad en ATP-agarosa. Comprobamos que al tratarse con fosfatasa, FtsA pierde su capacidad de unirse a la columna (Figura 16d). Esta misma columna, se usó posteriormente con una muestra sin tratar con fosfatasa, para comprobar que la columna conservaba su capacidad de unión intacta.

Anteriormente hemos señalado que FtsA puede encontrarse localizada tanto en la fracción soluble como en la membrana. Se examinó si la proteína FtsA asociada a la membrana presenta también capacidad de unirse a las columnas de ATP-agarosa. La extracción de FtsA de la membrana requiere el uso de detergentes usándose en este caso Triton X-100 al 0.5%. El extracto

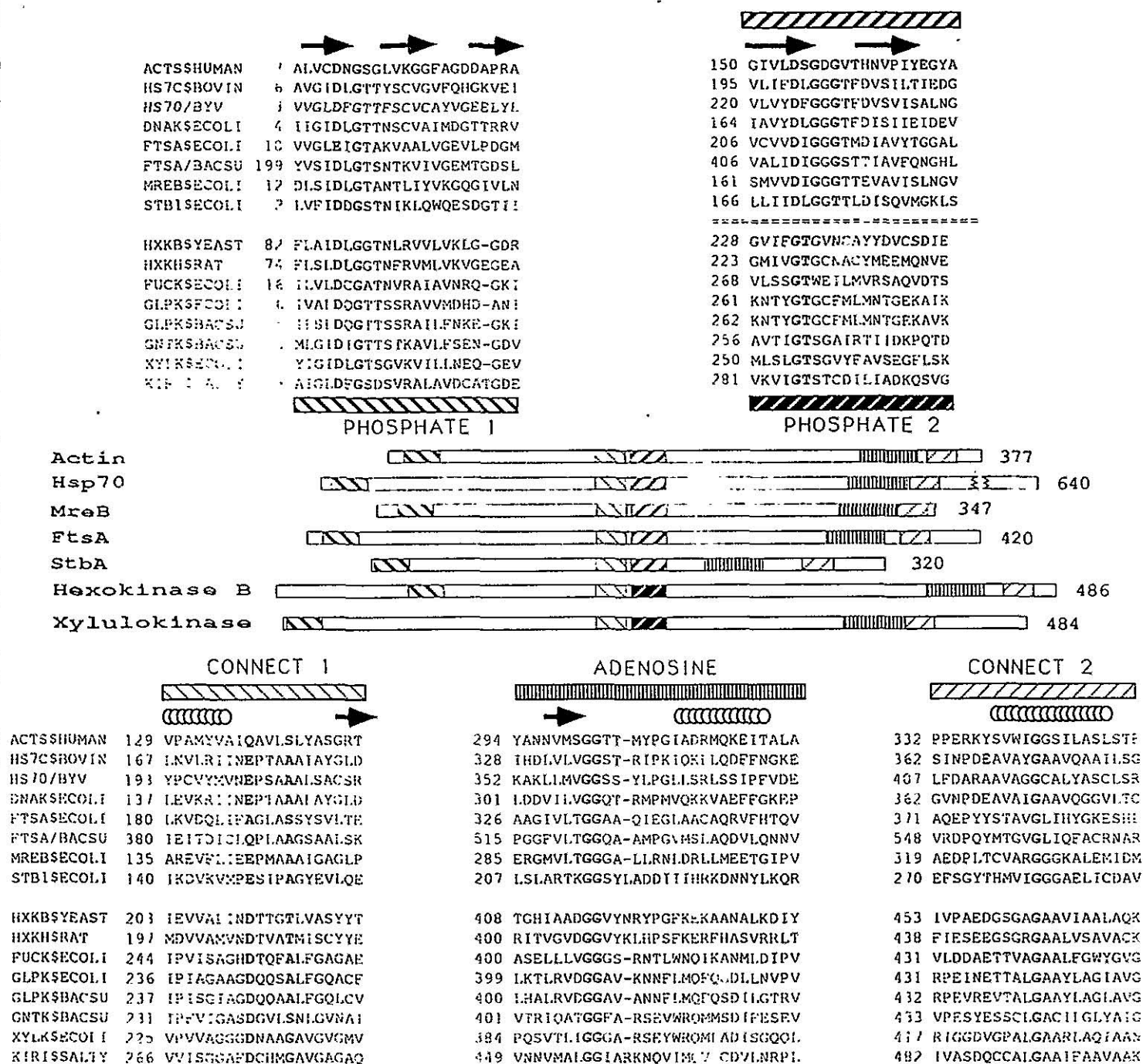


Figura 14: Regiones de homología entre FtsA y otras proteínas que unen ATP.

En la parte central se representa un esquema de la molécula de FtsA con la posición de las distintas regiones que presentan homología con otras proteínas. Alrededor del esquema se muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos de estas regiones entre las distintas proteínas. (Tomado de Bork *et al.* (14)).

Tabla 5: Mutaciones mapeadas en el gen *ftsA*.

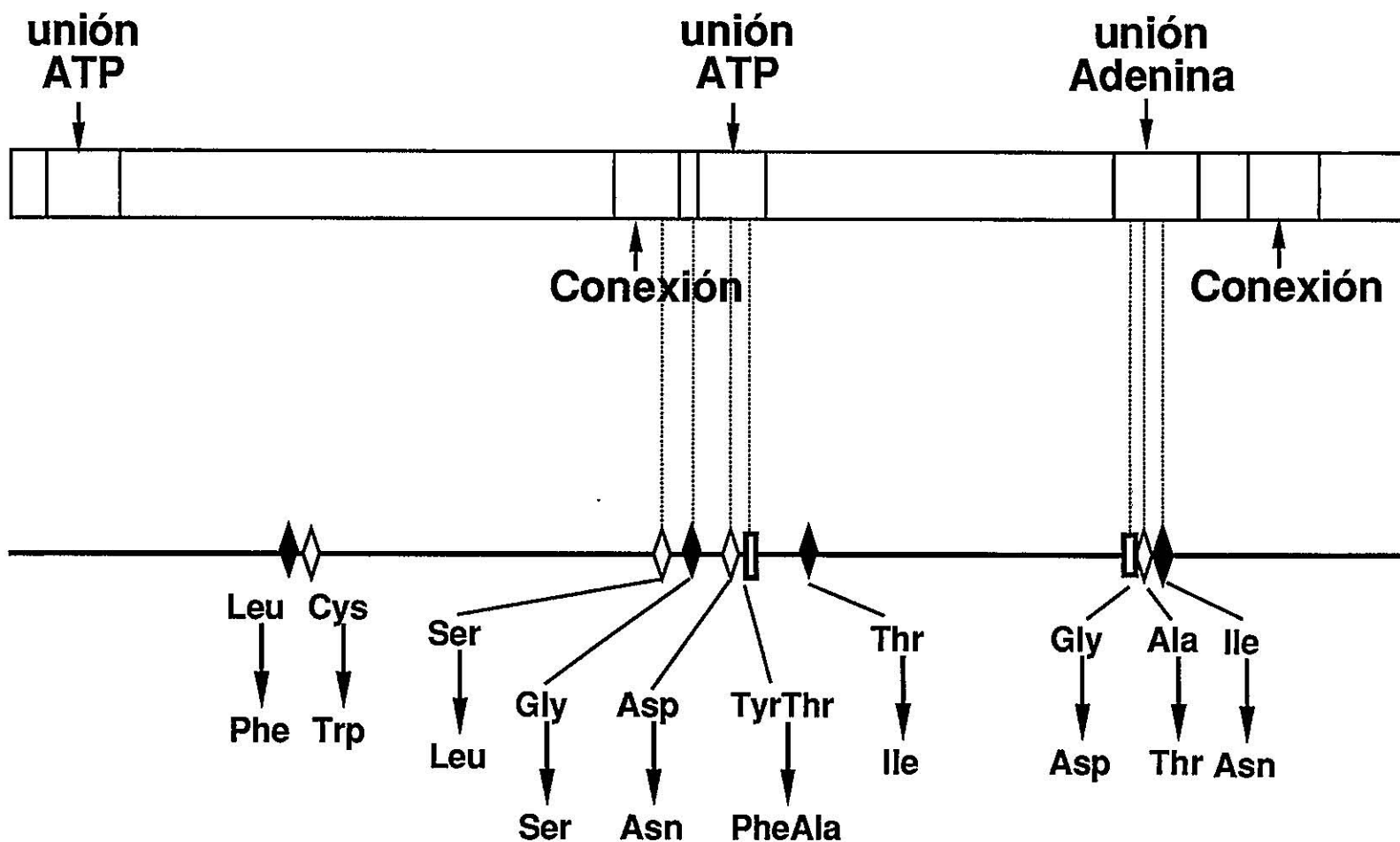
ALELO	POSICION	aa. PROTEINA SILVESTRE	aa. PROTEINA MUTANTE	FENOTIPO	REF.
8-25	83	Leu	Phe	Irreversible	65
22	90	Cys	Trp	Reversible	65
40	192	Ser	Leu	Irreversible	65
31,21,28	205	Gly	Ser	Irreversible	65
6	217	Asp	Asn	Reversible	65
101	221	Tyr	Phe	Letal	este trabajo
	222	Thr	Ala		
3	240	Thr	Ile	Irreversible	31
102	336	Gly	Asp	Letal	este trabajo
2	338	Ala	Thr	Reversible	31
13	341	Ile	Asn	Irreversible	66

El carácter de cada mutación ha sido descrito de acuerdo a Tormo y Vicente (75). Está basado en el comportamiento de la recuperación de la división de los filamentos de los mutantes *ftsA* a la temperatura permisiva en presencia de cloranfenicol. Si los filamentos pueden dividirse a 30° C en presencia de cloranfenicol el alelo es de carácter reversible. Si por el contrario, no pueden dividirse, debido a que necesita la síntesis de nueva proteína FtsA para la recuperación de la septación, el alelo es de carácter irreversible. La denominación de letal para los dos alelos de *ftsA* producidos mediante mutagénesis dirigida *in vitro* se ha dado por el hecho de que son incapaces de complementar tanto a un mutante reversible como a uno irreversible, presumiblemente por una inactivación completa de la proteína.

Figura 15: Posición de las mutaciones *ftsA* en la secuencia primaria de la proteína.

Se representan las diferentes mutaciones que han sido descritas para FtsA. El aminoácido superior es el que se encuentra en la proteína salvaje y el inferior el encontrado en la proteína mutante. También se indica el carácter de la mutación (ver tabla 5).

20aa
|-----|



conteniendo FtsA se cromatografió en una columna de ATP-agarosa equilibrada en el mismo tampón con detergente. En estas condiciones FtsA no es retenida por la columna. Para evitar artefactos debidos a la presencia del detergente se repitió el mismo experimento tras eliminar el detergente mediante diálisis. La muestra así tratada se pasó nuevamente por una columna de ATP-agarosa. Tampoco en este caso se detectó la unión de FtsA a la columna (figura 16e).

En colaboración con el grupo de Sander diseñamos un experimento de mutagénesis *in vitro* para obtener una mutación dentro de uno de los dominios involucrados en la unión de ATP. La mutación se diseñó para cambiar la glicina en posición 336 que es un residuo muy conservado en todos los miembros de la familia de proteínas que unen ATP. Cambiamos esta glicina por aspártico obteniendo así la proteína FtsA102. Al igual que FtsA101 esta nueva proteína es incapaz de complementar a los mutantes D2 y D3. En concordancia con el modelo propuesto por Sander (14) al examinar la capacidad de unión de FtsA102 a columnas de ATP-agarosa comprobamos que se había perdido por completo (figura 16f). Este resultado confirma una de las predicciones de la homología de FtsA con la familia de proteínas que unen ATP.

De estos resultados se desprende que la capacidad de unión a ATP que muestra FtsA está relacionada con el estado de fosforilación de la proteína y con la localización celular de la misma. No podemos excluir sin embargo que la proteína no fosforilada, o asociada a la membrana, no posea esta capacidad, aunque muy disminuída y no detectable por ello. Tampoco podemos descartar que la proteína FtsA fosforilada esté tan débilmente unida a la membrana que pueda liberarse de ella durante el proceso de aislamiento de una forma similar a lo que le ocurre a FtsZ (ver más adelante).

Figura 16: Unión de FtsA a columnas de ATP-agarosa.

Inmunotransferencias de los perfiles de elución de distintos experimentos de cromatografía de afinidad con AMP o ATP-agarosa. Cultivos de VIP194 (hiperproductor de FtsA) y VIP240 (hiperproductor de FtsA102) se crecieron en presencia de IPTG durante 2 horas y fraccionados tal y como se describe en el apartado 16 de materiales y métodos para pasarlos posteriormente por columnas de ATP-agarosa. Después de incubar durante 2 horas, la columna era lavada con diferentes tampones. Se recogió cada una de las fracciones y se analizaron por SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia. En cada carril se cargó material equivalente a 0.25 unidades de DO_{600} .

A: M: MC1061, proteína total. P: VIP194, fracción precipitada al 30% de sulfato amónico. E: lo mismo que lo anterior eluido de la columna. L1: primer lavado con tampón imidazol. KCl: lavado con tampón imidazol + 1 M de KCl. L2: segundo lavado con tampón imidazol. ATP: lavado con tampón imidazol + 5 mM de ATP. C: material retenido por la columna.

B: Igual que A pero incubando la muestra con 10 mM de ATP previamente a su paso por la columna.

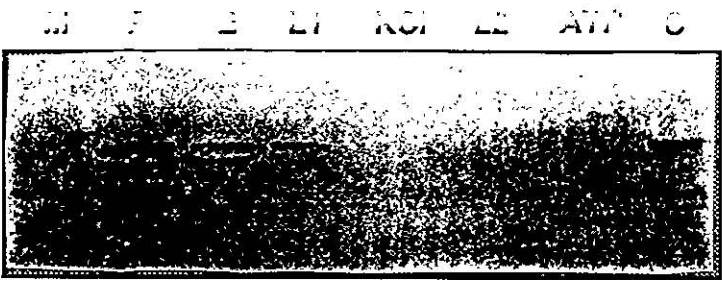
C: Comportamiento de FtsA en columnas de AMP y ATP-agarosa. P: VIP194, fracción precipitada al 30% de sulfato amónico. E_{AMP} : lo mismo que la anterior eluido de la columna de AMP-agarosa. E_{ATP} : lo mismo que el carril P eluido de la columna de ATP-agarosa. C_{AMP} : Material retenido por la columna de AMP-agarosa. C_{ATP} : Material retenido por la columna de ATP-agarosa. Esta membrana fue revelada usando un conjugado anti-IgG-fosfatasa alcalina (ver materiales y métodos).

D: Igual que A pero tratando la muestra con fosfatasa alcalina previamente a su paso por la columna.

E: Como en A pero usando proteína FtsA proveniente de la fracción de membrana de la estirpe VIP194.

F: Como en A pero usando la fracción soluble de la estirpe hiperproductora de FtsA102.

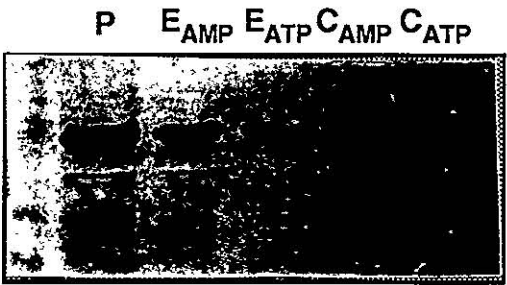
Soluble



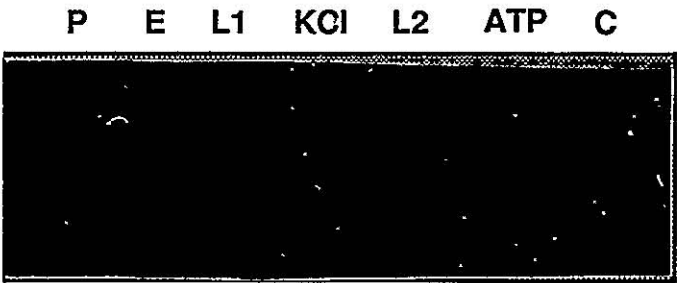
+ ATP



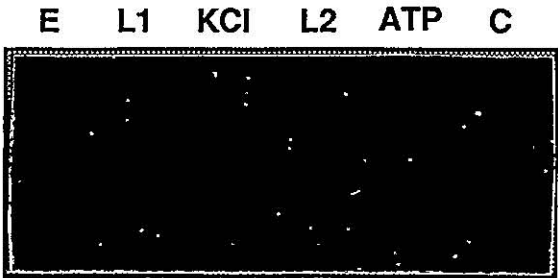
AMP / ATP



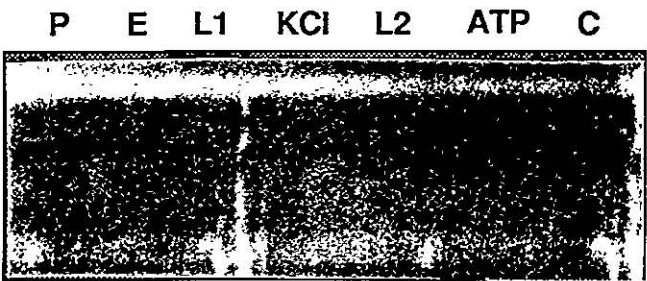
Fosfatasa
alcalina



Membrana



Ftsa102



2. LA PROTEÍNA FtsZ ES UN FACTOR LIMITANTE DE LA DIVISION CUYA TRANSCRIPCION OSCILA DURANTE EL CICLO CELULAR.

La proteína FtsZ parece intervenir en las primeras etapas que regulan la división celular. Esta proteína es el blanco de un número de inhibidores endógenos de la división celular que participan en la coordinación de este proceso con la replicación del DNA y con el emplazamiento correcto del septo. (24, 25).

La cuantificación del contenido celular de FtsZ indica que existen alrededor de 5000 moléculas por célula (Figura 17). Según los resultados de Bi y Lutkenhaus (12) la población de FtsZ migra desde el citoplasma hasta un anillo central, asimilable al septo, cuando la célula se va a dividir. Esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio que indican una localización citoplasmática mayoritaria para la proteína FtsZ. Hemos observado asimismo que en determinadas condiciones de fraccionamiento celular la proteína FtsZ puede asociarse a la fracción de membrana (figura 18). Se desconoce por el momento si esta asociación puede correlacionarse con el fenómeno natural observado por Bi y Lutkenhaus.

2.1. LA VIDA MEDIA DE FtsZ ES SUPERIOR A UN TIEMPO DE GENERACION.

Un punto no dilucidado por los experimentos antes referidos es el destino de la proteína FtsZ una vez acabada la división celular. Es más, no se sabe si toda la población de FtsZ está formada por moléculas activas o no. Como primera aproximación al problema hemos determinado la vida media de ésta proteína, para averiguar si se degrada con rapidez, en cuyo caso desaparecería rápidamente una vez cumplida su función, o si por el contrario permanece en la célula por períodos largos por lo que sería necesario encontrar otra explicación.

Para medir la vida media de FtsZ se realizó un experimento de "pulso y caza" con células de MC1061, crecidas en medio mínimo, usando ^{35}S -metionina. En la figura 19 se muestra el resultado del experimento y se deduce que su vida media es de unos 90 minutos. Esta vida media permite que FtsZ esté presente en la célula durante al menos un tiempo de generación.

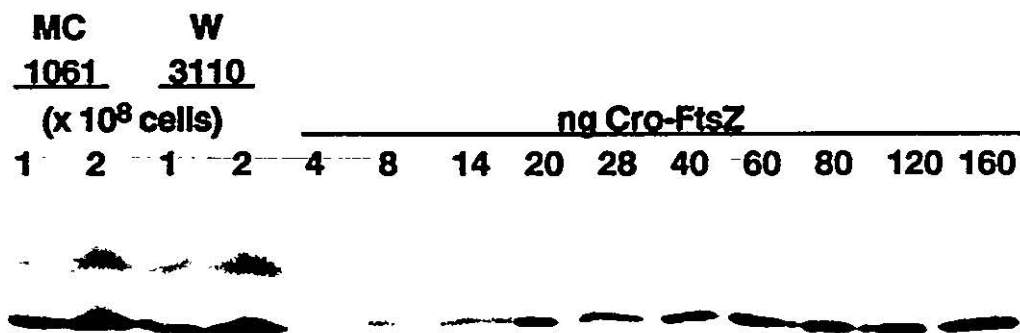


Figura 17: Contenido celular de FtsZ.

Extractos totales correspondientes a 10⁸ y a 2 x 10⁸ células de las estirpes MC1061 y W3110 y diferentes cantidades de una preparación purificada de proteína Cro-FtsZ fueron analizadas por SDS-PAGE y usadas para cuantificar FtsZ por medio de técnicas de inmunotransferencia como se describe en materiales y metodos.

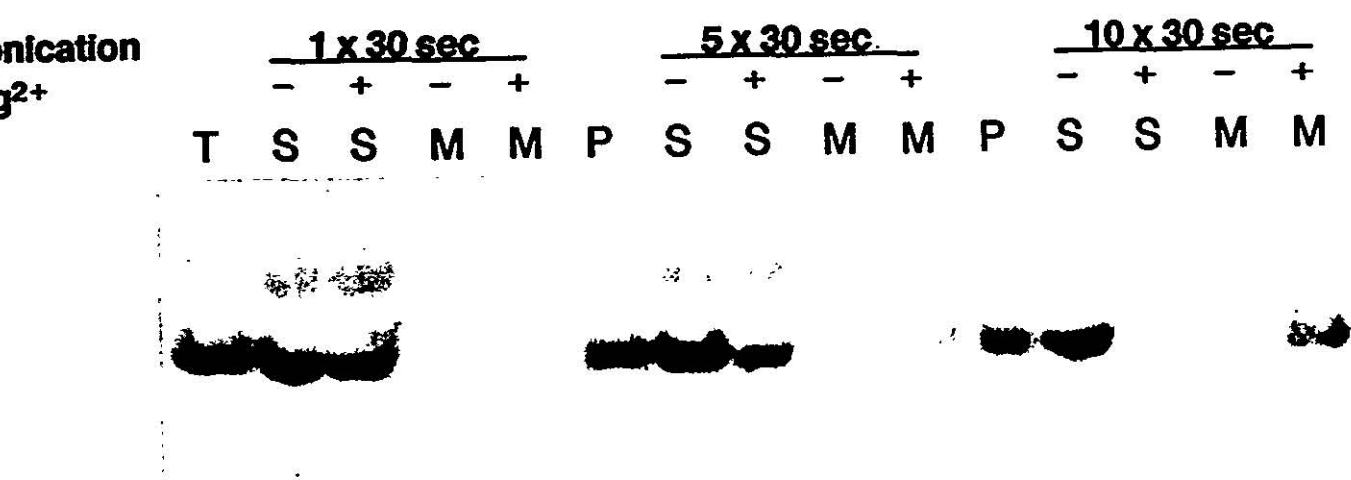


Figura 18: Localización de FtsZ en presencia de Mg^{2+} .

Cantidades correspondientes a 0.5 unidades DO_{600} de extracto de células totales (T), soluble (S) y fracción de membrana (M) de W3110 fueron analizadas mediante antisuero MVJ9 contra FtsZ por los procedimientos inmunológicos descritos en materiales y métodos. Para la obtención de las fracciones de membrana y soluble las células fueron rotas mediante sonicación durante diferentes periodos de tiempo indicados, en ausencia o en presencia de 10 mM de Mg^{2+} . 30 ng de la proteína de fusión Cro-FtsZ (P) fue usada como marcador de FtsZ.

Figura 19: Vida media de la proteína FtsZ.

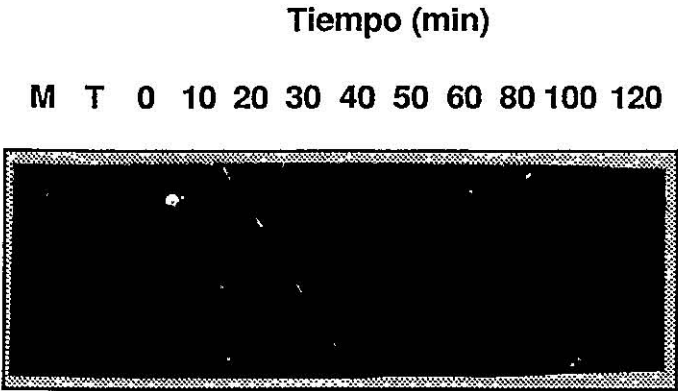
La vida media de FtsZ se midió mediante un experimento de pulso y caza seguido de una inmunoprecipitación de FtsZ en la estirpe MC1061 (ver material y métodos). En el carril M se cargaron 0.45 unidades de D.O.₅₄₀ de un cultivo de MC1061. En el carril T se cargaron 0.05 unidades de D.O.₅₄₀ del cultivo de MC1061 que había crecido en presencia de ³⁵S-metionina. Los siguientes carriles muestran el resultado de la inmunoprecipitación a los tiempos indicados.

A: Inmunotransferencia de la inmunoprecipitación de FtsZ. La inmunotransferencia se reveló con el sistema proteína A-peroxidasa y DAB. La gran banda superior es la cadena pesada de la inmunoglobulina. La banda inferior es la proteína FtsZ.

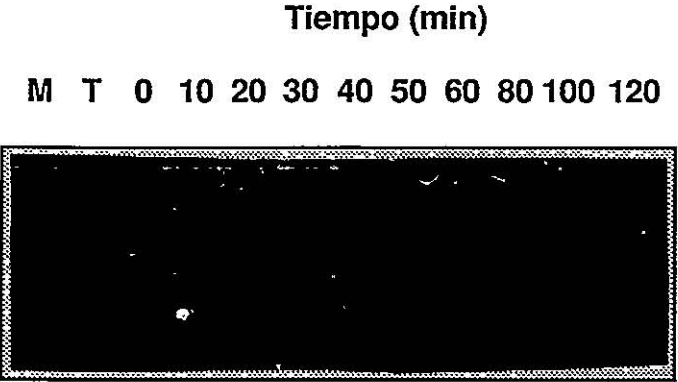
B: Autoradiografía de la inmunotransferencia anterior.

C: Cinética de la desaparición de la marca incorporada en la proteína FtsZ. Cada dato se calculó obteniendo la relación entre la intensidad de la banda obtenida por autoradiografía respecto a la intensidad de la misma banda obtenida por inmunotransferencia. El conjunto de datos se relativizó con respecto al dato obtenido para tiempo cero.

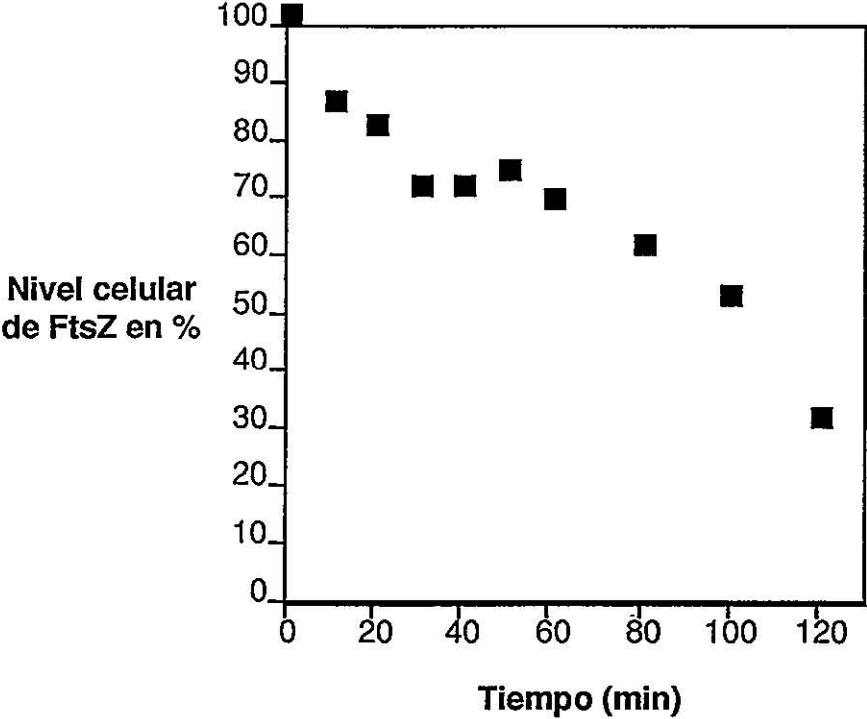
A



B



C

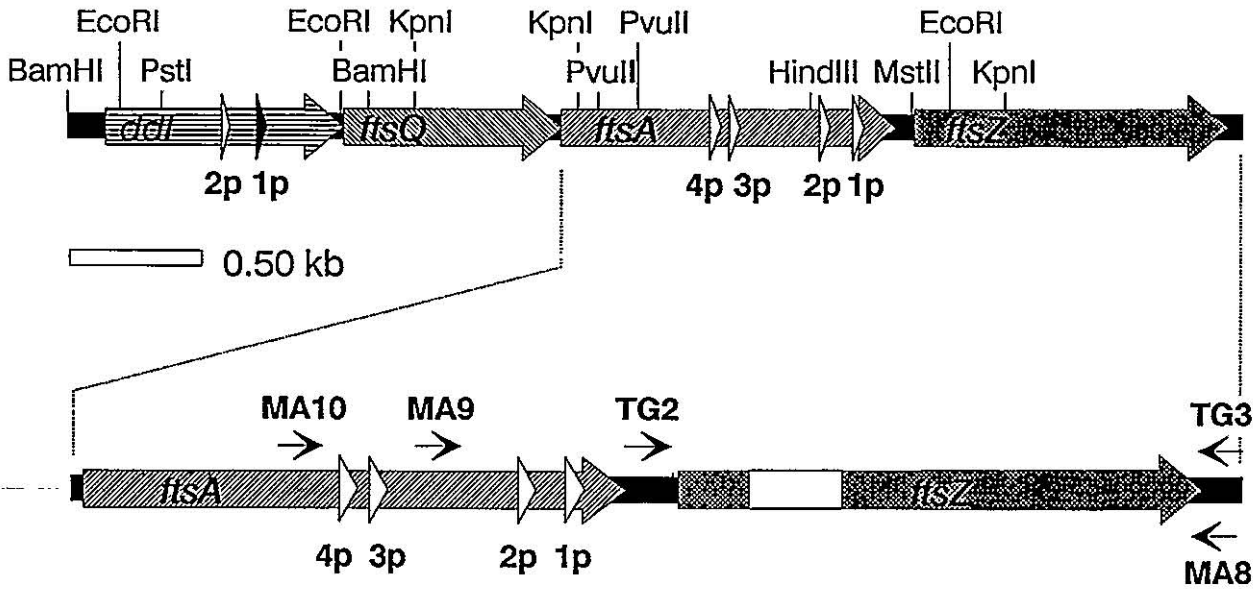


2.2 LA TRANSCRIPCION DE *ftsZ* OSCILA DURANTE EL CICLO CELULAR.

Se ha indicado en la introducción que la organización del operón *ftsQAZ* comienzan a ser comprendida. Al no haber terminadores de la transcripción dentro del operón *ftsQAZ* la transcripción del gen *ftsZ* no sólo es debida a la actividad de los cuatro promotores del propio gen localizados dentro de la secuencia de *ftsA*, sino también a los dos promotores localizados antes del gen *ftsQ*. Si suponemos que la vida media de los diferentes mensajeros es similar, la contribución de los diferentes promotores al total de la transcripción de *ftsZ* se puede evaluar mediante un ensayo de titulación de transcripción (ver material y métodos) usando diferentes oligonucleótidos cebadores (figura 20). Así, mientras que el cebador TG2 permite la cuantificación de todos los mensajeros que contienen a *ftsZ*, el cebador MA9 permite cuantificar aquellos mensajeros que se originan corriente arriba de los promotores *ftsZp1* y *ftsZp2*. El cebador MA10 puede usarse para cuantificar mensajeros originados a partir de los promotores de *ftsQ*. Hemos encontrado que en células de B/rK creciendo exponencialmente en M9+glucosa, tan sólo el 10% de los mensajeros que contienen a *ftsZ* se originan en los promotores situados delante del gen *ftsQ*, un 11% lo son a partir de los promotores *ftsZp3* y *ftsZp4*, y el 79% restante de los promotores proximales *ftsZp1* y *ftsZp2*.

Usando la esta técnica con cultivos sincrónicos de la estirpe B/rK, encontramos que la transcripción de *ftsZ* oscila durante el ciclo celular. La figura (figura 21) muestra los niveles de mRNA de *ftsZ* medidos con los cebadores TG2 o MA9 durante el ciclo celular de B/rK. Contrariamente a la pauta oscilante que presenta el mRNA de *ftsZ* total medido por el cebador TG2, los transcritos originados por delante de los dos promotores proximales presentan una cinética que podríamos esperar por la simple duplicación del DNA del gen *ftsZ*. Los períodos C y D de la estirpe B/rK fueron determinados previamente (40, 41) siendo 42 y 14 minutos respectivamente. El gen *ftsZ* se localiza en el minuto 2.5 del mapa genético de *E. coli* (6) a unos 18.5 minutos de mapa del origen de replicación. Luego puede ser replicado aproximadamente 16 minutos después de la iniciación de la replicación del DNA. El tiempo de generación del experimento fue de 45 minutos, así que el gen *ftsZ* se duplicaría a los 5 y a los 50 minutos después del nacimiento. Esto indica que la transcripción originada desde los promotores distales del gen *ftsZ* y de los promotores del gen *ftsQ* no está regulada por el ciclo celular. Los niveles de transcripción medidos con el cebador MA9 han sido sustraídos de aquellos medidos con TG2 para obtener las cantidades de mRNA originados desde los promotores proximales a *ftsZ*. Puede verse que la transcripción iniciada desde estos promotores es activada unas cuatro veces 15 minutos antes de la división.

A



B

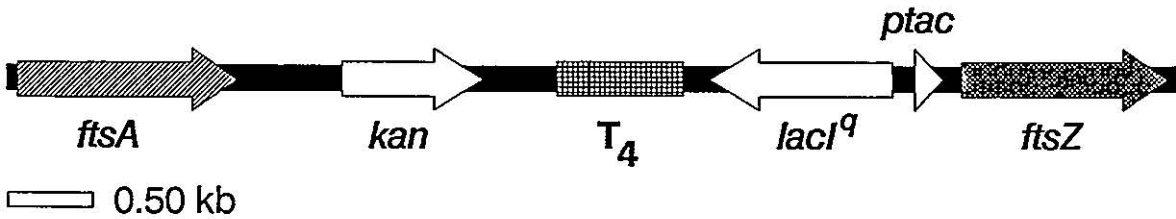


Figura 20: Estructura del operón *ftsQAZ* en una estirpe salvaje y en la estirpe VIP205 de *E. coli*.

A: Mapa del operón *ftsQAZ*. Los promotores están indicados como cabezas de flecha. La posición del promotor *gearbox* está indicada con una cabeza de flecha negra. Las pequeñas flechas situadas por encima, simbolizan los cebadores usados en los ensayos de titulación de la transcripción del mRNA de *ftsZ*. La zona vacía dentro del gen *ftsZ* indica la región deletcionada para obtener el cRNA competidor (ver material y métodos).

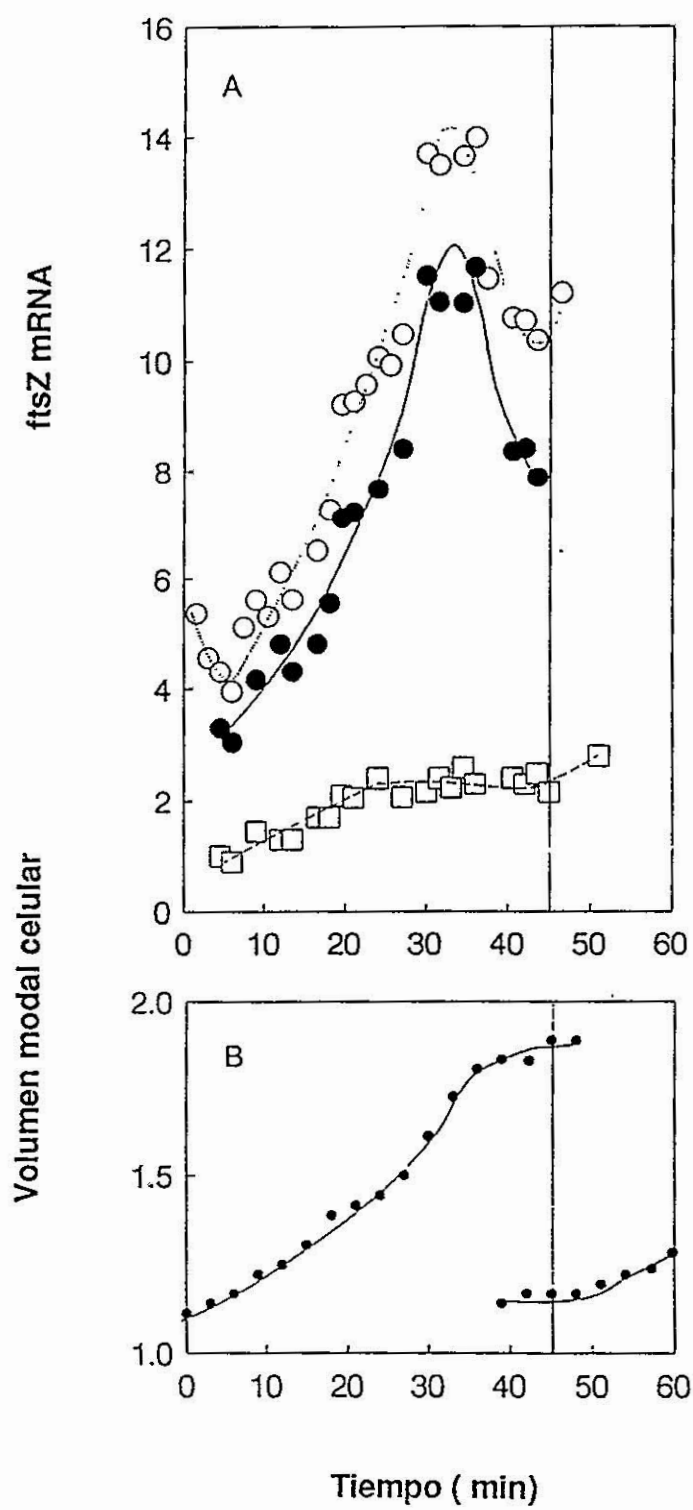
B: Estructura del locus cromosómico *ftsAZ* alterado en la estirpe VIP205. Las cuatro copias del terminador de transcripción (T_4) desacoplan al gen *ftsZ* de sus promotores naturales. El gen *ftsZ* está bajo el control del promotor *tac* el cual es reprimido por las altas cantidades de represor producidas por *lacI^q* en ausencia de IPTG. La resistencia a kanamicina se utiliza para comprobar que la construcción genética es correcta.

Figura 21: La transcripción del gen *ftsZ* regulada por ciclo celular es debida a los dos promotores proximales.

Se cultivaron células recién nacidas de la estirpe B/rK en M9+glucosa y se recogieron muestras de este cultivo a intervalos cortos de tiempo para seguir el crecimiento celular ; número de células y niveles de mRNA de *ftsZ* durante un ciclo de división. Las líneas verticales indican el tiempo al cual se han dividido la mitad de las células .

A: La titulación de los transcritos de *ftsZ* se realizó en muestras de RNA total a las que se añadieron cantidades conocidas de un RNA competidor. Los niveles totales de mRNA de *ftsZ* (círculos blancos) y los originados a partir de promotores situados por delante de los dos promotores proximales (cuadrados blancos) se midieron usando los cebadores TG2 y MA9 respectivamente durante el proceso de amplificación. Los niveles de mRNA de *ftsZ* debidos a los dos promotores proximales (círculos negros) se calcularon mediante la sustracción de los valores obtenidos con MA9 de aquellos obtenidos con TG2. Los valores representados son la expresión de la razón molar mRNA/cRNA relativa a la obtenida con MA9 en el primer punto.

B: Representación de los volúmenes modales celulares relativos a los volúmenes teóricos de una célula recién nacida. Este volumen se calculó del volumen medio celular de un cultivo creciendo exponencialmente como se describe en Donachie *et al.* (30).



2.3 LA PROTEÍNA FtsZ ES UN FACTOR LIMITANTE DE LA DIVISION CELULAR.

Se ha descrito en dos publicaciones independientes que FtsZ es una proteína esencial para la división celular (21, 58). En ambos casos se usó un enfoque similar construyendo una estirpe que contuviera una copia cromosomal truncada de *ftsZ* y una copia salvaje clonada en un replicón termosensible. Cuando los niveles de FtsZ caen por debajo de los encontrados en una estirpe salvaje las células comienzan a filamentar. Esto sugiere que los niveles totales de la proteína FtsZ deben de estar estrictamente regulados para producir una división celular correcta. Sin embargo ninguno de estos sistemas permite evaluar el papel limitante de FtsZ en la división celular en unas condiciones de crecimiento equilibradas.

Para determinar directamente si FtsZ es un factor limitante para la división celular en condiciones equilibradas de crecimiento, se utilizó la estirpe VIP205 que contiene el gen estructural *ftsZ* desacoplado de sus promotores naturales y colocado bajo el control del promotor *tac*. Al no haber ninguna otra copia del gen *ftsZ*, el crecimiento de la estirpe VIP205 depende de la adición externa de IPTG. Experimentos preliminares mostraron que la estirpe VIP205 crecía de forma similar a la estirpe parental en placas con IPTG a concentraciones entre 10 y 30 μ M. Se midió el efecto de la variación de las concentraciones de IPTG en el crecimiento y los parámetros morfológicos de VIP205 creciendo la estirpe exponencialmente con 15 ó 30 μ M IPTG y transfiriendo las células al mismo medio pero con diferentes concentraciones de IPTG. La figura 22 muestra cómo el volumen celular es dependiente del contenido celular de FtsZ. Tanto las concentraciones bajas como altas de IPTG producen filamentación. Se concluye que FtsZ es limitante para la división celular. Un dato adicional es que los volúmenes medios de VIP205 son indistinguibles de los de la estirpe parental sólo cuando el contenido de FtsZ es un 40% más alto que en la estirpe parental. De la misma forma, las células de VIP205 con un contenido de FtsZ similar al parental son un 20 a un 40% más grande. Se concluye que la expresión dependiente de ciclo celular de *ftsZ* desde sus propios promotores no es estrictamente requerida para asegurar una correcta temporización de la división celular sugiriendo la existencia de factores limitantes adicionales para la división celular.

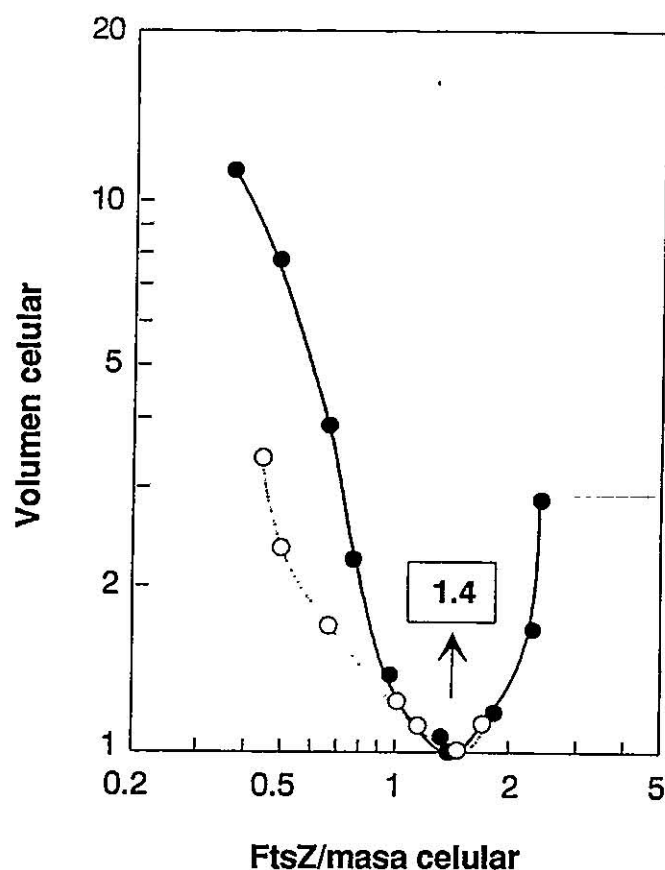


Figura 22: FtsZ es un factor limitante de la división celular.

Se cultivaron células de VIP205, las cuales contienen la copia cromosómica del gen *ftsZ* bajo el control del promotor *tac*, en fase exponencial en LB con 15 μM (símbolos negros) o 30 μM (símbolos blancos) de IPTG. Se transfirieron al mismo medio con concentraciones de IPTG que variaban entre 3 y 300 μM. Después de 5 a 6 generaciones de crecimiento exponencial se tomaron muestras para medir el volumen celular y el contenido de FtsZ por masa celular como se describe en materiales y métodos. Los volúmenes celulares y el contenido de FtsZ por masa celular se calcularon con respecto a los de la estirpe parental, MC1061, creciendo en las mismas condiciones.

3. FtsQ ES UNA PROTEÍNA INTEGRADA EN LA MEMBRANA CITOPLASMATICA ESENCIAL PARA LA DIVISION CELULAR

FtsQ es una proteína integral de membrana de 276 aminoácidos que cumple su función en las etapas iniciales de la septación. El gen *ftsQ* se transcribe junto a *ftsA* y *ftsZ* a partir de dos promotores situados justo delante de *ftsQ*. Uno de estos promotores es un promotor *gearbox* cuya actividad es inversamente dependiente de la velocidad de crecimiento (1). Su nivel celular es muy bajo, unas 30 moléculas por célula (19) pero la falta de acción de la proteína o su incorrecta localización (31, 32) conduce a la filamentación por inactivación de la división celular. Se ha postulado que FtsQ estaría orientada con un dominio N-terminal de 25 aminoácidos hacia el citoplasma, una zona hidrofóbica de otros 25 aminoácidos integrada en la membrana y el resto de la proteína hacia el periplasma (figura 23). Es ahí donde se supone que ejerce su acción, aunque esta permanece aún desconocida.

3.1 FtsQ SE LOCALIZA EN LA MEMBRANA CITOPLASMATICA DE *E. coli*.

Resultados de Storts *et al.* (70) muestran que FtsQ se localiza en la membrana de maxicélulas. Corroboramos estos resultados con una estirpe hiperproductora de FtsQ que contenía al gen *ftsQ* bajo control del promotor *tac* (Estirpe VIP147). Observamos que la hiperproducción de FtsQ no producía aparentemente un efecto nocivo a la célula, como ya se había descrito anteriormente para otras construcciones génicas (32). Para determinar la correcta localización en condiciones fisiológicas se realizó la detección de FtsQ en cultivos de estirpes salvajes que alcanzaban la fase de crecimiento estacionario. La entrada en esta fase está acompañada por un incremento de la transcripción del operón *fts* relativo al resto de operones de la célula (1).

Aunque disponíamos de sueros policlonales contra FtsQ, su baja concentración en la célula podría dificultar su discriminación en inmunotransferencias. Para evitar ese problema se construyó una estirpe termonula para el gen *ftsQ* (ver material y métodos). La estirpe termonula VIP210 muestra un crecimiento normal a 30°C, pero filaminta a la temperatura restrictiva de 42°C. Esta estirpe contiene en el cromosoma una delección interna en el gen *ftsQ*, siendo las funciones de este gen aportadas en *trans* por el plásmido pMPV4*rep(ts)*. A 42°C este plásmido no se replica y la copia salvaje *ftsQ*⁺ desaparece por dilución del plásmido, por lo que la bacteria filaminta. El comportamiento de esta estirpe confirma que *ftsQ* es un gen esencial.

Se usaron fracciones de la estirpe VIP210 como control para identificar la banda correspondiente a la proteína FtsQ. En el mutante termonulo la banda de FtsQ está ausente cuando las células se incuban durante 2 horas a 42°C. En la figura 24 se muestra, que en

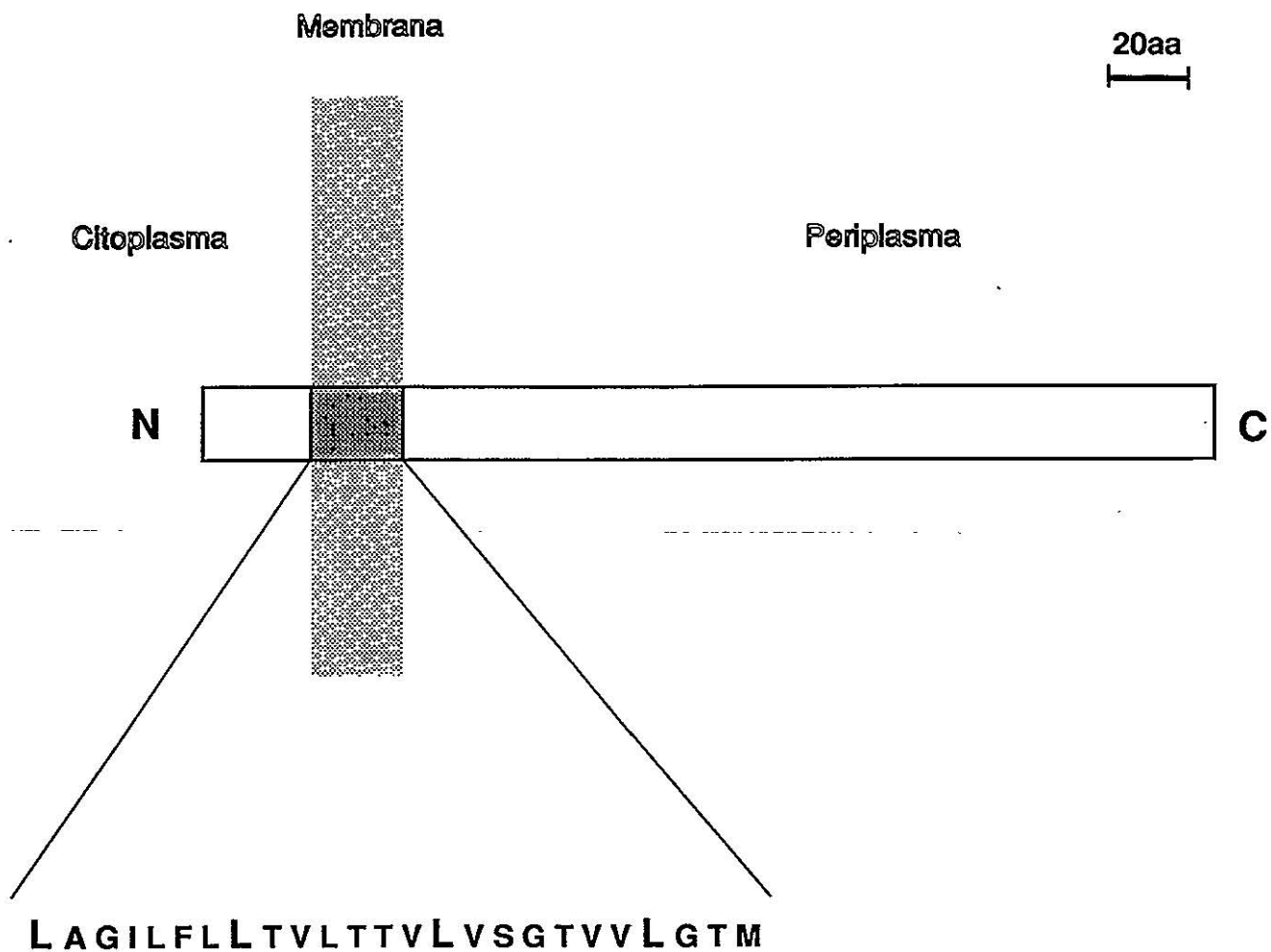


Figura 23: Esquema de la proteína FtsQ.

En el diagrama se representa la posición de la región hidrofóbica de FtsQ (zona sombreada) y su secuencia mostrando la posible cremallera de leucinas. Asimismo se indica la orientación de la proteína en la membrana.

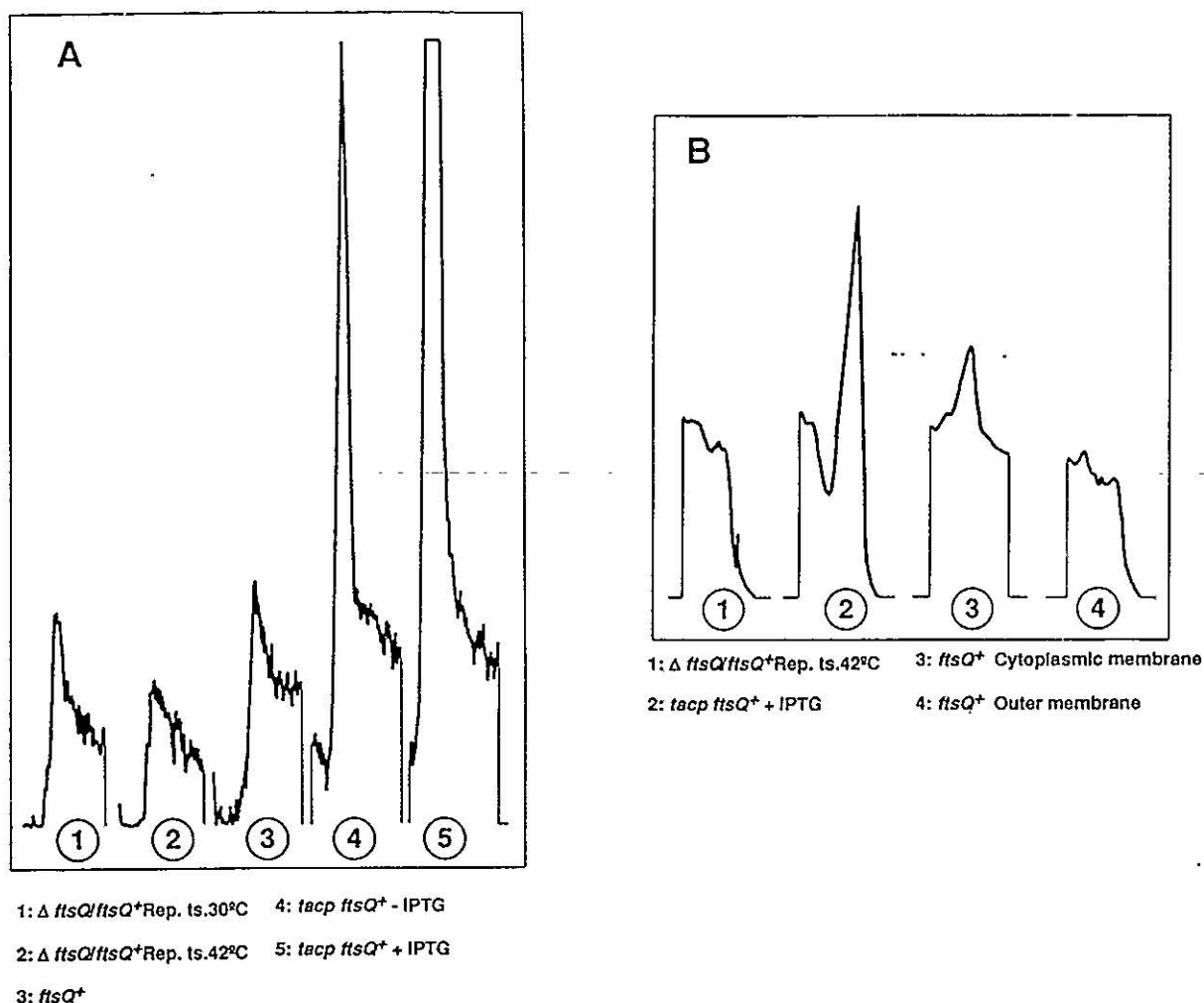


Figura 24. Localización de FtsQ a niveles fisiológicos dentro de la membrana de *E. coli*.

A: Fracciones totales de membrana correspondientes a 25 unidades de DO_{600} de las estirpes VIP210 (picos 1 y 2: $\Delta ftsQ/ftsQ^+$ Rep), MC1061 (pico 3: *ftsQ⁺*), y VIP147 (picos 4 y 5: *tacP ftsQ⁺* sin IPTG y con IPTG respectivamente) separadas mediante SDS-PAGE. El cultivo de VIP210 se dividió en dos alícuotas incubadas a 30°C (pico 1) o 42°C (pico 2) durante 2 horas. La inducción de la expresión de *ftsQ* se realizó por adición de IPTG 1 mM durante 1 hora a una alícuota del cultivo de VIP147 (pico 5).

B: Fracciones totales de membrana de las estirpes VIP210 incubado a 42°C durante 2 horas (línea 1: $\Delta ftsQ/ftsQ^+$ Rep) y VIP147 incubado en presencia de IPTG 1 mM durante 1 hora (línea 2: *tacP ftsQ⁺*). Fracción soluble en sarkosil de la fracción total de membranas de la estirpe MC1061 (línea 3: *ftsQ⁺*). Fracción insoluble en sarkosil de la fracción total de membranas de la estirpe MC1061 (línea 4: *ftsQ⁺*).

Los picos correspondientes a FtsQ se detectaron usando el suero MVJ11 preadsorbido como se describe en material y métodos.

condiciones fisiológicas, FtsQ está presente en bajas cantidades y se localiza en la membrana citoplasmática. Como cabía esperar de una proteína que se localiza en la membrana citoplasmática, FtsQ es solubilizada por 0.5% de sarkosil.

3.2 LA REGION HIDROFOBICA DE FtsQ ES IMPORTANTE TANTO PARA SU LOCALIZACION COMO PARA SU FUNCION.

La presencia de un dominio hidrofóbico en la región amino-terminal de FtsQ se dedujo de la secuencia nucleotídica de *ftsQ* (64). Estudios preliminares (32) habían mostrado que la presencia de esta región es fundamental para la función y localización de esta proteína en la membrana. Las formas delecionadas de la proteína FtsQ en esta región no sólo son incapaces de complementar a una estirpe mutante en *ftsQ*, sino que además, se localizan en el citoplasma en forma soluble.

Un estudio más detallado de la secuencia del dominio hidrofóbico de FtsQ nos permitió descubrir una posible cremallera de leucinas compuesta por cuatro leucinas espaciadas por seis aminoácidos (figura 25). Mediante mutagénesis dirigida sobre el gen *ftsQ*⁺ (ver material y métodos) obtuvimos dos tipos de modificaciones en las leucinas centrales. En una de ellas la tercera leucina había sido cambiada por valina, (alelo *ftsQ11*). En la segunda modificación se cambiaron las dos leucinas centrales por sendas valinas, (alelo *ftsQ12*). Ambas mutaciones fueron confirmadas por secuenciación de DNA. En ambos casos se conserva el carácter hidrofóbico de la región N-terminal.

Para comprobar si la alteración de estas leucinas es importante para la funcionalidad de la proteína, se clonaron en PBR322 el alelo *ftsQ*⁺ y los alelos mutantes *ftsQ11* y *ftsQ12*. Los plásmidos obtenidos, pMSV6, pMSV61 y pMSV62, se usaron para transformar la estirpe termosensible KJB22 *ftsQ1*. Comprobamos que la presencia del alelo *ftsQ*⁺ o *ftsQ11* permitía el crecimiento de la estirpe mutante en placas de LAT a 42°C. No era así cuando el alelo presente era *ftsQ12*. Cuando analizamos la localización de estas proteínas en estirpes hiperproductoras se observó que las tres estaban localizadas en la membrana citoplasmática (figura 26). Sin embargo, la proteína FtsQ12 parece ser más susceptible de degradación que FtsQ y FtsQ11. Esto nos indicó que la zona hidrofóbica de la proteína FtsQ puede jugar un papel en la funcionalidad de la molécula aparte de ser el dominio responsable de la correcta ubicación de la proteína. El posible papel de este dominio puede ser el permitir una interacción con otros componentes del septador por medio de la cremallera de leucinas, o consigo misma para producir un dímero.

25	32	39	46	Nº residuo
<hr/>				
L	A	G	I	L
F	L	L	T	V
L	T	V	L	V
S	G	T	V	V
L	G	T	M	
FtsQ				
L	L	V	L	FtsQ11
L	V	V	L	FtsQ12

Figura 25: Cremallera de leucinas de la proteína FtsQ.

En la parte superior se muestra la secuencia de la cremallera de leucinas de la proteína FtsQ. En la parte inferior se muestran los cambios introducidos en las proteínas mutantes FtsQ11 y FtsQ12.

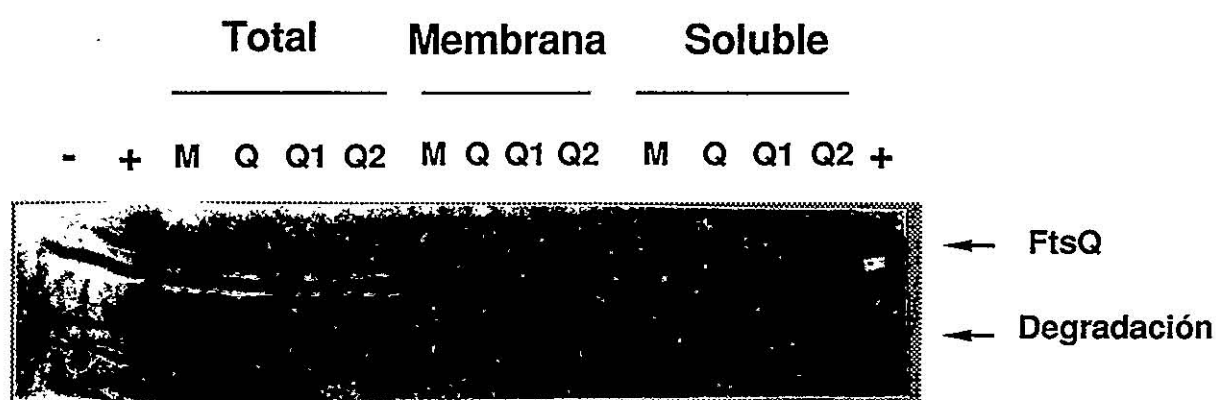


Figura 26: Localización de las proteínas FtsQ11 y FtsQ12.

Cultivos correspondientes a las estirpes VIP146, 147, 148 y 149 se crecieron en LB e inducidos con IPTG como se describe en materiales y métodos. Posteriormente se recogieron las células y se fraccionaron tal y como se describe en materiales y métodos. Las fracciones correspondientes a extractos de proteína total (Total), fracción de membrana (Membrana) y fracción soluble (Soluble), se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia con antisuero contra FtsQ, MVJ11, preadsorbido con un extracto de la estirpe VIP 210. La membrana se reveló con proteína A-oro. En cada carril se cargaron 0.25 unidades D.O.₆₀₀. Para identificar la banda de FtsQ se añadieron extractos de la estirpe hiperproductora VIP226 inducida (+) y sin inducir(-) (ver material y métodos).

Carriles M: Fracciones provenientes de VIP146.

Carriles Q: Fracciones provenientes de VIP147 (Hiperproductor de FtsQ).

Carriles Q1: Fracciones provenientes de VIP148 (Hiperproductor de FtsQ11).

Carriles Q2: Fracciones provenientes de VIP149 (Hiperproductor de FtsQ12).

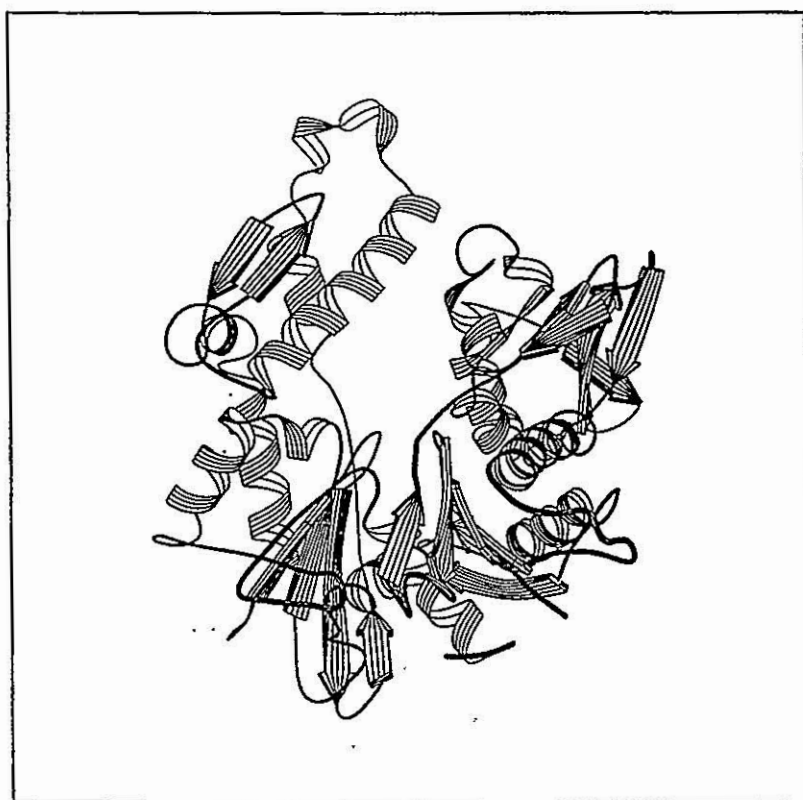
DISCUSION

Los productos de los genes *ftsQ*, *ftsA* y *ftsZ* son esenciales para la división celular y la supervivencia de *E. coli*. En este trabajo hemos estudiado el papel de estas tres proteínas en la división celular.

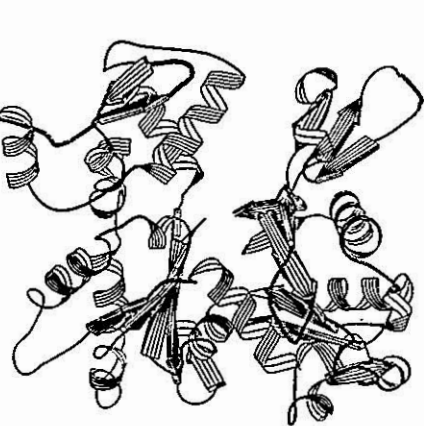
Como se ha indicado en la introducción, los tres genes forman un operón en el minuto 2.5 del mapa genético de *E. coli* cuya expresión génica parece seguir unas pautas peculiares, exhibiendo propiedades tales como la presencia de un promotor *gearbox*, promotores para alguno de sus genes dentro de las secuencias de genes estructurales precedentes, la ausencia de terminadores fuertes de transcripción y quizás el acoplamiento traduccional que es considerado como una forma de expresión de aquellos cuyos productos son requeridos en niveles proporcionales entre sí. Se ha postulado que el producto de estos tres genes formaría parte del septador (78).

Hemos encontrado que FtsA se localiza tanto en la membrana citoplasmática como en el citoplasma. Experimentos anteriores consistentes en ensayos de tripsinización con una mezcla de vesículas de membrana con orientación normal e invertida mostraron que la proteína FtsA unida a la membrana estaba localizada en la cara citoplasmática de la misma (57). Además, se ha comprobado que la localización celular de FtsA está relacionada con su fosforilación. Así, la proteína FtsA encontrada en la fracción de membrana está defosforilada, mientras que en la fracción soluble se encuentra tanto la forma fosforilada como no fosforilada. El hecho de que FtsA sea susceptible de fosforilación ya había sido apuntado por Robinson y colaboradores (63) al describir una homología entre FtsA y la kinasa de ciclo celular de levaduras, *cdc2*, en los lugares en que esta última se fosforila. Sin embargo, el resultado de los experimentos aquí mostrados hace suponer que el lugar de fosforilación de FtsA es otro.

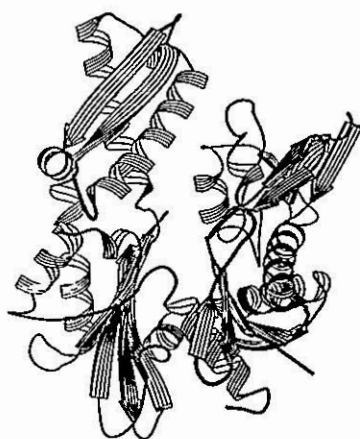
Hemos indicado que el modelo precedente ha sido criticado por el grupo de Sander en base a la falta de homología de la proteína FtsA de *B. subtilis* con las kinasas de levaduras (14). Aunque no descartan que FtsA pueda ser una kinasa perteneciente a otro grupo estructural, los mismos autores proponen una homología distinta. FtsA pertenecería a una familia de proteínas con capacidad de unir ATP entre las que se encuentran tanto proteínas eucariotas, como actina, hexoquinasa o hsp70, o procariotas, como Dnak o MreB. En concordancia con esta homología, se ha visto que la mayor parte de las mutaciones condicionales descritas para FtsA afectan a dominios responsables de la unión a ATP. Esta homología permitió a este grupo predecir un modelo tridimensional para la proteína FtsA (figura 27). Para validar este modelo, se diseñaron ensayos de unión de FtsA a ATP, encontrándose que FtsA presenta esa capacidad. Se determinó también que esta actividad sólo es detectable en la proteína fosforilada presente en la fracción



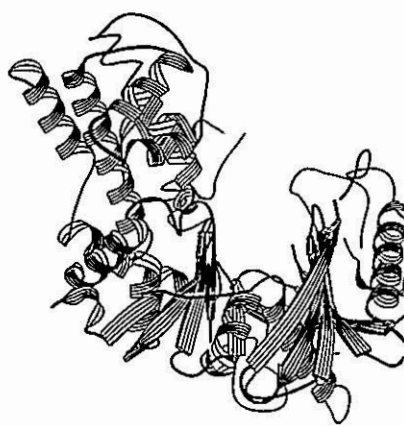
FtsA



Actina



Hsc70



Hexoquinasa

Figura 27: Modelo tridimensional de FtsA.

Predicción de estructura terciaria de la proteína FtsA realizada por Alfonso Valencia. También se han representado las estructuras tridimensionales de actina, fragmento N-terminal de Hsc70 y hexoquinasa, producidas mediante difracción de rayos X. El modelo fue construido plegando primeramente los dominios que presentan homología entre FtsA y las demás proteínas y posteriormente plegando el resto de la molécula en base a este primer plegamiento. Se han coloreado los diferentes dominios como en la figura 15. (cortesía de Alfonso Valencia).

soluble. No podemos descartar por el tipo de experimentos realizados que la proteína FtsA no fosforilada, presente en la fracción de membrana y en la fracción soluble, también pueda unir ATP pero muy débilmente. En colaboración con el grupo de Sander se diseñó un experimento de mutagénesis dirigida *in vitro* sobre una glicina muy conservada en todos los miembros de la familia de proteínas que unen ATP. La incapacidad de unión al ATP mostrada por la proteína mutante parece apoyar el modelo propuesto para FtsA.

Con los datos presentados postulamos el siguiente modelo de acción para FtsA que está recogido en la figura 28. La proteína se sintetizaría en el citoplasma en una forma inactiva y permanecería en esa forma hasta el momento en que es necesitada por la célula. Entonces sería fosforilada, lo que permitiría la unión de FtsA a ATP. Una vez que se ha unido al nucleótido, la proteína ejercería su acción en la membrana interaccionando con otros componentes del septador. Esto produciría su defosforilación y la hidrólisis de la molécula de ATP, pero no la liberación de FtsA de la membrana. Una vez inactivada la proteína sería degradada por la proteasa Lon.

La proteína FtsZ también es un componente del septador. Su capacidad de formar una estructura anular en el futuro sitio de septación (12) sugiere que FtsZ puede ser un elemento citoesquelético que puede iniciar la división celular cuando se ensamblan el suficiente número de moléculas. Hemos determinado que el nivel celular de FtsZ de unas 5000 moléculas por célula y la vida media de esta proteína, unos 90 minutos, la permitiría existir durante al menos un ciclo celular. Podríamos esperar que la expresión del gen *ftsZ* fuera clave entre los mecanismos reguladores de la división celular.

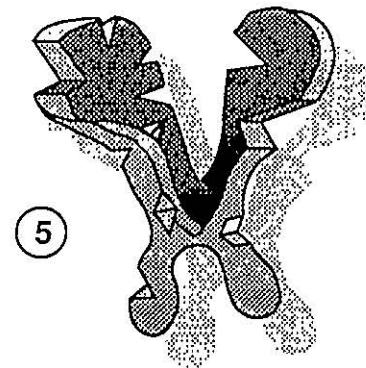
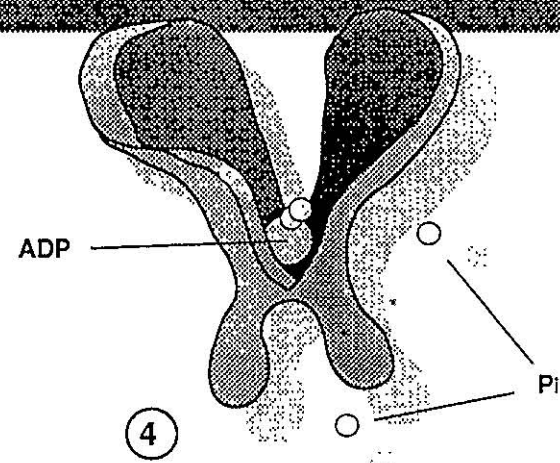
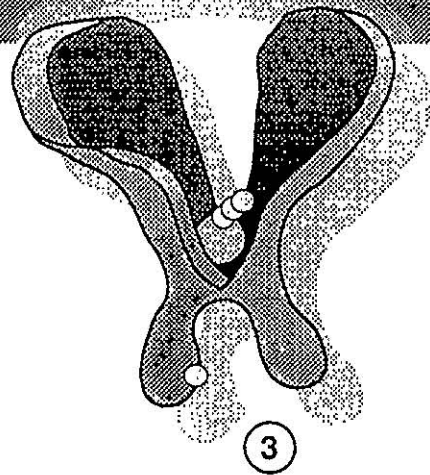
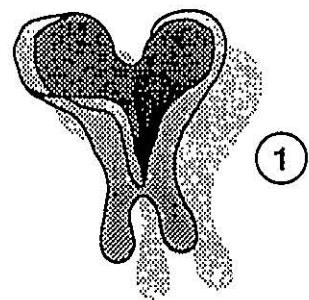
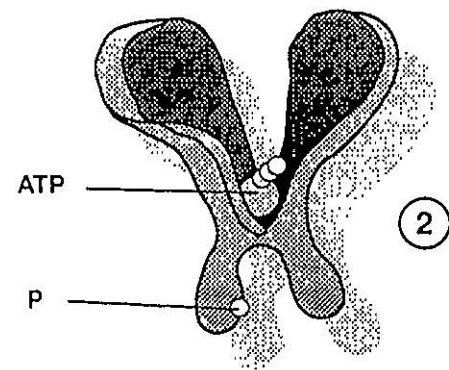
Hemos usado un ensayo de titulación de la transcripción sobre cultivos sincrónicos para medir los niveles de transcripción de *ftsZ* durante el ciclo celular. Nuestros resultados muestran que los niveles de transcripción de *ftsZ* oscilan durante el ciclo celular alcanzando un máximo cuando se inicia una nueva ronda de replicación. Datos de nuestro laboratorio (T. Garrido, comunicación personal) muestran que la transcripción del gen *ftsZ* no se incrementa inmediatamente después de un *shift-up* nutricional, indicando que este gen está bajo un control dependiente del ciclo celular y no está limitado por la disponibilidad de RNA-polimerasa y precursores. Es más, la transcripción de *ftsZ* se incrementa fuertemente cada vez que se inicia un nuevo ciclo de replicación. Usando diferentes cebadores en los ensayos de titulación de la transcripción hemos mostrado que los promotores *ftsZ1p* y *ftsZ2p* son responsables de un 80% del total de la transcripción del gen *ftsZ* y mucho más importante, del comportamiento oscilatorio observado para la transcripción de este gen durante el ciclo celular de *E. coli*.

Figura 28: Modelo de actuación de la proteína FtsA.

Se presenta un modelo de trabajo del funcionamiento de la proteína FtsA. En un primer paso sería sintetizada en el citoplasma en una forma inactiva incapaz de unir ATP (1). Una fosforilación posterior capacitaría a la molécula para unir ATP (2). La proteína se dirigiría entonces a realizar su función en la membrana (3) donde se defosforilaría y perdería su molécula de ATP seguramente mediante una acción ATPásica (4). Una vez cumplida su función sería degradada (5).

Membrana

Citoplasma



El estudio de la estirpe VIP205 en la que el gen *ftsZ* ha sido desacoplado de sus promotores naturales y puesto bajo el control del promotor *tac* nos ha permitido determinar que FtsZ es un factor limitante de la división celular. La estirpe VIP205 sólo es viable en un estrecho rango de concentraciones de IPTG y su volumen es dependiente del contenido celular de FtsZ. Sin embargo, independientemente del contenido de FtsZ, las células nunca son más pequeñas que las células parentales, sugiriendo que FtsZ no debe de ser el único elemento limitante de la división. Por otro lado, células de VIP205 creciendo con una concentración particular de IPTG muestran una distribución de volúmenes que es indistinguible de aquella correspondiente a la estirpe parental. Estos resultados indican que la transcripción oscilatoria de *ftsZ* no es suficiente para explicar la precisión temporal de la división celular lo cual, de nuevo, nos indica la existencia de elementos adicionales limitantes para la división que podrían estar regulados de una manera dependiente de ciclo celular. El hecho de cómo FtsZ forma una estructura anular (12) sugiere que las células de *E. coli* requieren un nivel de FtsZ crítico en una edad celular determinada, p. ej. durante el inicio de la septación. *A priori* este nivel celular puede ser conseguido tanto por los promotores regulados por ciclo celular como por los no regulados, pero éste último produciría un inevitable exceso de FtsZ a otras edades celulares que no sean el inicio de septación. De acuerdo con esto, hemos observado que las células de VIP205 presentan un 40% más de FtsZ cuando la distribución de volúmenes es indistinguible de aquella obtenida con la estirpe parental crecida en las mismas condiciones.

La última proteína objeto de este estudio es FtsQ. Ya hemos indicado al comienzo de este capítulo que los promotores que determinan la expresión del gen *ftsQ* son los mismos que regulan a *ftsA* y también a parte (10%) de la transcripción de *ftsZ*. El nivel celular de proteína FtsQ es muy bajo, unas 30 moléculas por célula (19), pero incluso en estas cantidades, la proteína es esencial para la célula como se muestra por el comportamiento de la estirpe termonula VIP210. La expresión del gen a niveles más altos es tolerada por la célula (32). Utilizando como controles la estirpe termonula VIP210 y una estirpe hiperproductora se ha determinado la localización en la membrana citoplasmática de la proteína FtsQ en condiciones fisiológicas. Experimentos anteriores (32) sugerían que el dominio hidrofóbico presente en el extremo N-terminal de la proteína FtsQ era el responsable de la correcta localización de la misma. Dentro de esta secuencia hidrofóbica hemos encontrado una posible cremallera de leucinas. Las cremalleras de leucinas son dominios de dimerización (17), aunque el hecho de encontrar una en la secuencia de FtsQ no significa que esta proteína dimerice (16). Estos dominios han sido encontrados en proteínas citoplasmáticas procariotas y eucariotas, aunque más frecuentemente en estas últimas. En todos los casos, la cremallera es una α -hélice de carácter anfipático y la dimerización se produce por la interacción hidrofóbica entre las leucinas. De demostrarse que esta cremallera de leucinas es un dominio de

dimerización sería la primera que se localiza en el interior de una membrana y que no muestra un carácter anfipático. Nuestros experimentos de mutagénesis *in vitro* muestran que la secuencia de este dominio hidrofóbico no sólo es importante para la localización celular de FtsQ, sino también para su funcionalidad.

Estos resultados pueden indicar que la proteína FtsQ tenga un papel regulador sobre el sáculo ya sea directamente o por mediación de otra proteína. Es de notar que el número de moléculas de FtsQ coincide con el propuesto para la proteína PBP3 (66) así como con la proteína FtsL (37). Esta última también está localizada en la membrana con la misma orientación que FtsQ. Además también presenta una cremallera de leucinas en su secuencia, pero a diferencia de FtsQ, esta cremallera está localizada en la parte soluble de la proteína. El hecho de que la expresión de *ftsQ* sea simultánea a la de *ftsA* y *ftsZ* podría indicar también que actúa junto a ellas en el septador.

La posibilidad de que el ciclo celular de *E. coli* sea el resultado de la coordinación de múltiples procesos independientes (54) está apoyada por nuestros resultados sobre el control de la activación de FtsA, la regulación de la expresión de *ftsZ*, y la localización de la proteína FtsQ. Un organismo eucariótico como *Saccharomyces cerevisiae* entra en el proceso de división celular mediante la activación de la kinasa cdc28 por las ciclinas presentes en G1, en un punto denominado *START*, después del cual se inician al menos dos procesos, la replicación del DNA y la gemación (61). De manera similar, un organismo procariótico como *E. coli* puede coordinar la iniciación de la replicación del DNA y la división celular en un punto semejante al *START* de levaduras cuando se alcanza un umbral de actividad de la proteína DnaA (11), y por otro lado, la activación de la transcripción de los promotores de *ftsZ* produciría la acumulación de FtsZ hasta un nivel crítico que dispararía el proceso de división celular. En esta etapa temprana también actuaría la proteína FtsQ, según se deduce del comportamiento de los mutantes en *ftsQ*. Por el contrario, la proteína FtsA actuaría como una proteína de terminación coordinando el término de la replicación del DNA con la división celular mediante la ruta TER. Esta coordinación sería llevada a cabo por la activación de FtsA mediante una fosforilación. Finalmente, una vez acabada la septación, los productos del operón *min* mediante su interacción con FtsZ (23, 25), y paralelamente la defosforilación de FtsA y su posterior degradación, asegurarían la inactivación de la división en los polos de la célula.

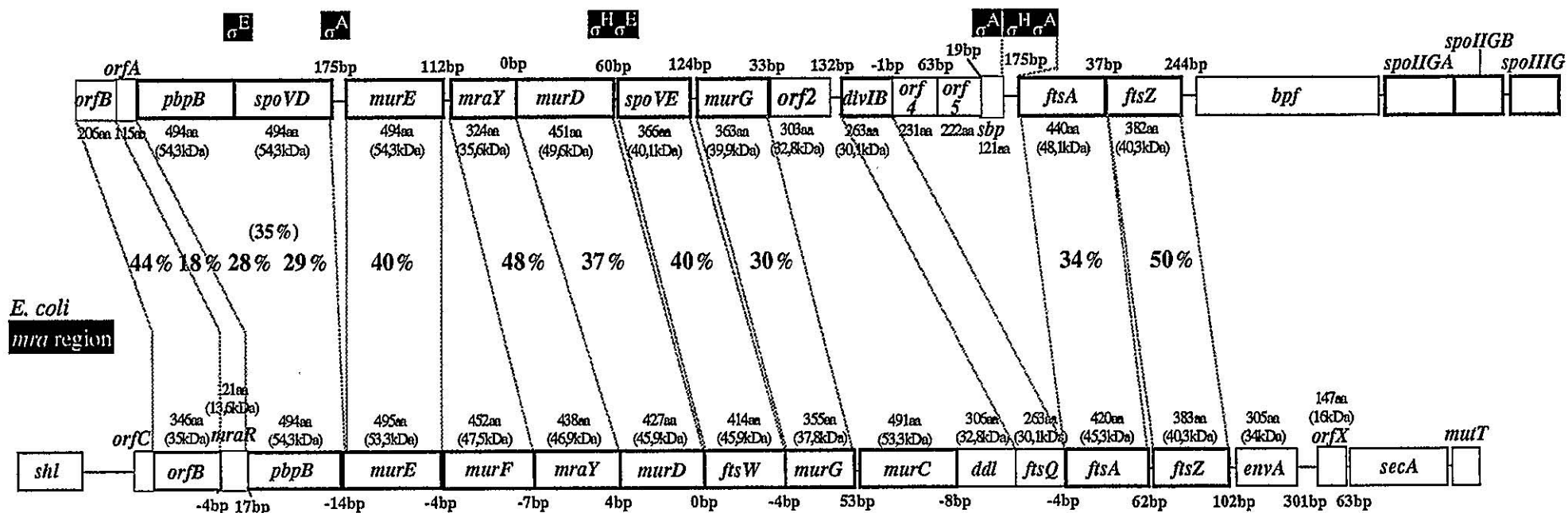
Genes homólogos a éstos han sido descritos en otros organismos procariotas. En el organismo gram-negativo *Bacillus subtilis* existe un agrupamiento en la región 133-135 que contiene genes que actúan tanto en la septación vegetativa como en la esporulación (figura 29). Los genes *ftsQ*, *ftsA*, y *ftsZ* de *E. coli* tienen su correspondiente homólogo, *divIB*, *ftsA* y *ftsZ* respectivamente, en *B. subtilis*. Sin embargo, en *B. subtilis*, el gen *divIB* está separado de *ftsA* y *ftsZ* y el gen *ftsA* es sólo esencial en la septación durante la esporulación y no durante el crecimiento vegetativo, aunque en su ausencia las células, si bien son viables, filantan.

Figura 29: Genes de división en *E. coli* y *B. subtilis*.

En la parte superior se representan los genes de la región 133-135° del mapa genético de *B. subtilis* y en la inferior el agrupamiento de genes del minuto 2.5 del mapa genético de *E. coli*. Los diferentes números indican las distancias entre los diversos genes en pares de bases, el número de aminoácidos y el peso molecular de las proteínas producidas por esos genes. También se dan el porcentaje de homología entre los diversos genes. En el mapa de la región 133-135° de *B. subtilis* se indica la regulación por los diferentes factores σ . (por cortesía de Adriano Henriques)

B. subtilis

133-135°



1kb

El gen *ftsZ* parece cumplir la misma función en ambas especies bacterianas. El hecho de que se hayan descrito proteínas homólogas en otros organismos procariotas (7, 8) y con funciones similares pero no idénticas, induce a pensar que aunque el mecanismo de control de la división celular sea complejo, ha sido conservado en organismos no estrechamente relacionados.

RESUMEN

Este trabajo se ha realizado con el fin de lograr un mayor entendimiento del papel realizado por FtsQ, FtsA y FtsZ tres proteínas esenciales para la división celular de *Escherichia coli*.

En el caso de la proteína FtsA, la descripción de distintas homologías que relacionaban a FtsA con otras proteínas de conocida actividad bioquímica, ha permitido abordar el propio papel bioquímico de FtsA. Hemos encontrado que FtsA es susceptible de ser fosforilada y que presenta una capacidad de unión a ATP, en consonancia con el modelo que presentan Sander y colaboradores. La demostración de que FtsA presenta esta actividad ha permitido predecir un modelo tridimensional para una proteína que aún no ha sido totalmente purificada. Asimismo, hemos integrado las diferentes actividades bioquímicas de FtsA junto con los datos de comportamiento de mutantes para el gen *ftsA*, en un modelo de actuación de ésta proteína en la célula.

El desarrollo de una técnica para la titulación de los niveles de transcripción de un gen, ha permitido determinar que la síntesis de mRNA del gen *ftsZ* presenta un comportamiento oscilatorio a lo largo del ciclo celular. Gracias a esta técnica también hemos demostrado que el comportamiento oscilatorio es debido a los promotores proximales *ftsZ1p* y *ftsZ2p*. La construcción de una estirpe en la que el gen *ftsZ* ha sido desacoplado de sus promotores naturales y puesto bajo control del promotor *tac* nos ha permitido determinar que la proteína FtsZ es un factor limitante para la división celular.

Finalmente, hemos establecido el carácter esencial del gen *ftsQ* y la localización en la membrana citoplasmática de la proteína FtsQ en condiciones fisiológicas. Mediante mutagénesis dirigida hemos determinado que la zona hidrofóbica de FtsQ no sólo es importante para la correcta localización de la proteína en la célula, sino que gracias a una secuencia que podría funcionar como una cremallera de leucinas, es también importante para la funcionalidad de la misma.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Aldea, M, T. Garrido, J. Plá and M. Vicente. 1990. Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoters. *EMBO J.* 9: 3787-3794.
- 2 Amster-Choder, O., and Wright, A. 1990. Regulation of Activity of transcriptional anti-terminator in *E. coli* by phosphorylation *in Vivo*. *Science*. 249: 540-542.
- 3 Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D. Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.) (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley Interscience.
- 4 Ayala, J.A., J. Plá, L.R. Desviat, and M.A. de Pedro. 1988. A *lacZ-pbpB* gene fusion coding for an inducible hybrid protein that recognizes localized sites in the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 3333-3341.
- 5 Bachmann, B.J., 1972. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K12. *Bacteriol. Rev.* 36: 525-557.
- 6 Bachmann, B.J., 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K12. Edition 8. *Microbial Rev.* 54: 130-197.
- 7 Beall, B. and Lutkenhaus, J. 1992. Impaired Cell Division and sporulation of a *Bacillus subtilis* strain with the *ftsA* gene deleted. *J. Bacteriol.* 174: 2398-2403
- 8 Beall, B. Lowe, M., and Lutkenhaus, J. 1988 Cloning and characterization of *Bacillus subtilis* homologs of *Escherichia coli* cell division genes *ftsZ* and *ftsA*. *J. Bacteriol.* 170: 4855-4864.
- 9 Becker-André, M., and Hahlbrock, K. 1989. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY). *Nucl. Acids. Res.* 17: 9437-9447.
- 10 Begg, K.J., G. F. Hatfull, and W.D. Donachie. 1980. Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of *Escherichia coli*: cell division gene *ftsQ*. *J. Bacteriol.* 144: 435-437.
- 11 Bernander, R., Dasgupta, S., and Nordström, K. (1991). The *E. coli* cell cycle and the plasmid R1 replication cycle in the absence of DnaA protein. *Cell* 64: 1145-1153.
- 12 Bi, E. and J. Lutkenhaus. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354: 161-164.
- 13 Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heybecker, H.W. Boyer, J.H. Crose, and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
- 14 Bork, P. Sander, C. and Valencia A. 1992. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7290-7294.
- 15 Boyd, A., and B. Holland. 1979. Regulation of the synthesis of surface proteins in the cell cycle of *E. coli* B/r. *Cell* 18: 287-296.
- 16 Brendal, and Karlin 1989. Too many Leucine-zippers?. *Nature* 341 574 575.
- 17 Buckland, R. and Wild, F. 1989. Leucine zipper motif extends. *Nature* 338 547.
- 18 Busby, S., H. Aiba, and B. deCrombrughe. 1982. Mutations in the *Escherichia coli* operon that define two promoters and the binding site and the binding site of the cyclic AMP receptor protein. *J. Mol. Biol.* 154: 211-227.

- 19 Carson, M., J.J. Barondess and J. Beckwith. 1991. The FtsQ protein of *Escherichia coli*: Membrane topology, abundance and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J. Bacteriol.* **173**: 2187-2195.
- 20 Cortay, J.C., D. Nègre, A.J. Cozzzone. 1991. Analyzing protein Phosphorylation in Prokaryotes. In T. Hunter and B.W. Sefton. *Methods in Enzymology*. Academic Press. Vol. **200**: 214-227.
- 21 Dai, K., and J. Lutkenhaus. 1991. *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 3500-3506.
- 22 Dai, K., and J. Lutkenhaus. 1992. The proper ratio of FtsZ and FtsA is required for Cell division to occur in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 6145-6151.
- 23 de Boer, P.A.J., R.E. Crossley, and L.I. Rothfield. 1989. A division factor inhibitor and a topological specificity factor coded by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* **56**: 641-649.
- 24 de Boer, P.A.J., Cook, W.R., and Rothfield, L. 1990. Bacterial cell division. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 249-274.
- 25 de Boer, P.A.J., R.E. Crossley, and L.I. Rothfield. 1992. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the minCDE system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 63-70.
- 26 de Boer, P.A.J., R.E. Crossley, and L.I. Rothfield. 1992. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**: 254-256.
- 27 Dente, L., M. Sollazo, C. Baldari, G. Cessareni, and R. Cortese. 1985. The pEMBL family of single stranded vectors., In *DNA cloning*. Vol. 1. Glover, D.M. (ed.). Oxford: IRL Press, pp. 101-107.
- 28 Donachie, W.D., K.J. Begg, J. F. Lutkenhaus, G.P.C. Salmond, E. Martinez-Salas and M. Vicente. 1979. Role of the *ftsA* gene product in control of *Escherichia coli* cell division. *J. Bacteriol.* **140**: 388-394.
- 29 Donachie, W.D., K.J. Begg, and N.F. Sullivan. 1984. The morphogenes of *Escherichia coli*. In J. Losick and L. Shapiro (ed.) *Microbial development*. Cold Spring Harbor Laboratories. Cold Spring Harbor, N.Y.
- 30 Donachie, W.D., K.J. Begg, and M. Vicente. 1976. Cell length, cell growth and cell division. *Nature*. **264**: 328-333.
- 31 Dopazo, A. 1989. Papel de los productos de *ftsQ* y *ftsA* de *Escherichia coli* en la septación. Tesis doctoral. Universidad Autonoma de Madrid. Facultad de Ciencias.
- 32 Dopazo, A., Palacios, P., Sánchez, M., Pla, J., and Vicente, M. 1992. An amino-proximal domain required for the localization of FtsQ in the cytoplasmic membrane, and for its biological function in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **6**: 715-722.
- 33 Dugaiczyc, A., H.W. Boyer and H.M. Goodman. 1975. Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* **96**: 171-184.
- 34 Fürste, J.P., W. Pansegrau, R. Frank, H. Blöcker, P. Scholz, M. Bagdasarian, and E. Lanka. 1986. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* **48**: 119-131.
- 35 Garrido, T. 1991. Promotores gearbox: un nuevo modo de expresion de genes de division y morfogenes de *Escherichia coli*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias
- 36 Gill, D.R., G.F. Hatfull and G.P.C. Salmond. 1986. A new cell division operon in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 134-145.

- 37 Guzman, L.M., Barondess, J.J., Beckwith, J. 1992 FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **174**: 7716-7728.
- 38 Hamilton, C.A., M. Aldea, B.K. Washburn, P. Babitzke, and S.R. Kushner. 1989. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 4617-4622.
- 39 Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- 40 Helmstetter, C.E. 1969. Methods for studying the microbial division cycle. In *Methods in Microbiology*. Vol. 1. J.R. Norris and D.W. Ribbons, eds. (New York; Academic Press, Inc.), pp. 327-363.
- 41 Helmstetter, C.E. and Pierucci, O. 1976. DNA synthesis during the division cycle of three substrains of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* **102**: 477-486.
- 42 Jones, C.A., and I.B. Holland. 1984. Inactivation of essential division genes, *ftsA*, *ftsZ*, suppresses mutations at *sfib*, a locus mediating inhibition during SOS response in *E. coli*. *EMBO J.* **3**: 1181-1186.
- 43 Kedzierski, W. and Porter, J.C. 1991. A novel non-enzymatic procedure for removing DNA template from RNA transcription mixtures. *Biotechniques* **10**: 210-214.
- 44 Kubitschek, H.E., Newman, C.N. 1978. Chromosome replication during the division cycle in slowly growing, steady-state cultures of three *Escherichia coli* B/r strains. *J. Bacteriol.* **136**: 179-190.
- 45 Laemmli, U.K., and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
- 46 Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**: 190-206.
- 47 Little, J.W., and D.W. Mount. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**: 11-12.
- 48 Lutkenhaus, J. F. 1990. Regulation of cell division in *E. coli*. *Trends in Genetics.* **6**: 22-25.
- 49 Mc Cathy, J.S. and Graham, C.W. 1991. DnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATP-ase activity.
- 50 Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 51 Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 52 Misusawa, S. and S. Gottesman. 1983. Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of *sulA* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 358-362.
- 53 Mukherjee, A., Dai, K., and Lutkenhaus, J. 1993. *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1053-1057.
- 54 Nordström, K., Bernander, R., and Dasgupta, S. 1991. The *Escherichia coli* cell cycle : one cycle or multiple independent processes that are coordinated. *Mol. Microbiol.* **5**: 769-774.
- 55 Osborn, M. J., J.E. Gander, E. Parisi, and J. Carson 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **247**: 3962-3972.

- 56 O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- 57 Pla, J., Dopazo, A. and Vicente, M. 1990. The native form of FtsA, a septal protein of *Escherichia coli* is located in the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **172**: 5097-5102.
- 58 Pla, J., M. Sánchez, P. Palacios, M. Vicente, and M. Aldea. 1991. Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol. Microbiol.* **5**: 1681-1686.
- 59 Phillips, T.A. Vicki, V. Bloch, P.L., Neidhardt, F.C. 1987. Gene-Protein Index of *Escherichia coli* K-12, Edition 2. En *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., and Umberger, H.E (eds.). Washington D.C., American Society of Microbiology, pp 919-966.
- 60 RayChaudhuri, D., and J.T. Park. 1992. *Escherichia coli* cell division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* **359**: 251-254.
- 61 Reed, S.I. 1992. The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 529-561.
- 62 Ricard, M. and Hirota, Y. 1973. Process of cellular division in *Escherichia coli*: physiological study on thermosensitive mutants defective in cell division. *J. Bacteriol.* **116**: 314-322.
- 63 Robinson, A.C., Collins, J.F., Donachie, W.D. 1987. Prokaryotic and eukaryotic cell-cycle proteins. *Nature*. **328**. 766.
- 64 Robinson, A.C., D.J. Kenan, G.F. Hatfull, N.F. Sullivan, R. Spiegelberg, W.D. Donachie. 1984. DNA sequence and transcriptional organisation of essential cell division genes *ftsQ* and *ftsA* of *Escherichia coli*: evidence for overlapping transcriptional units. *J. Bacteriol.* **160**: 546-555.
- 65 Robinson, A.C., Begg, K.J., Donachie, W. 1988. Mapping and characterization of mutants of the *Escherichia coli* cell division gene, *ftsA*. *Mol. Microbiol.* **2**. 581-588
- 66 Robinson, A.C., Begg, K.J., and MacArthur, E. 1991. Isolation and characterization of intragenic suppressors of an *Escherichia coli* *ftsA* mutation. *Res. Microbiol.* **142**: 623-631.
- 67 Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **74**: 5463-5467.
- 68 Sherman, M. Y., A.L. Goldberg. 1991. Involvement of the chaperonin DnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *E. coli*. *EMBO J.* **11**: 71-77.
- 69 Spratt, B.G., L.D. Bowler, A. Edelman, and J.K. Broo, e-Smith. 1988. Membrane topology of penicillin-binding proteins 1b and 3 of *Escherichia coli* and the production of water-soluble forms of high-molecular-weight penicillin-binding proteins. En *Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function*. Actor, P., L. Daneo-Moore, M.L. Higgins, M.R.J. Salton, and G.D. Shockman (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 292-300.
- 70 Storts, D.R., O.M. Aparicio, J.M. Schoemaker, and A. Markovitz. 1989. Overproduction and identification of the *ftsQ* gene product, an essential cell division protein in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **171**: 4290-4297.
- 71 Tormo, A., J.A. Ayala, M.A. de Pedro, M. Aldea, and M. Vicente. 1986. Interaction of FtsA and PBP3 proteins in the *Escherichia coli* septum. *J. Bacteriol.* **166**: 985-992.

- 72 Tormo, A., A. Dopazo, A.G. de la Campa, M. Aldea, and M. Vicente. 1985. Coupling between DNA replication and cell division mediated by the FtsA protein in *Escherichia coli*: a pathway independent of the SOS response, the TER pathway. *J. Bacteriol.* **164**: 950-953.
- 73 Tormo, A., C. Fernández-Cabrera, and M. Vicente. 1985. The *ftsA* gene product: a possible connection between DNA replication and septation in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 239-244.
- 74 Tormo, A. E. Martínez-Salas, and M. Vicente. 1980. Involvement of the *ftsA* gene product in late stages of the *Escherichia coli* cell cycle. *J. Bacteriol.* **141**: 806-813.
- 75 Tormo, A., and M. Vicente. 1984. The *ftsA* gene product participates in formation of the *Escherichia coli* septum structure. *J. Bacteriol.* **157**: 779-784.
- 76 Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- 77 VanderWinkel, E., M. de Vlieghere, M. Fontaine, D. Charles, F. Denamur, D. Vandevoorde and D. de Kegel. 1976. Septation deficiency and phospholipid perturbation in *Escherichia coli* genetically constitutive for the beta oxidation pathway. *J. Bacteriol.* **127**: 1389-1399.
- 78 Vicente, M., Palacios, P., Dopazo, A., Garrido, T., Pla, J., and Aldea, M. 1991. On the chronology and topography of bacterial cell division. *Res. Microbiol.* **142**: 253-257.
- 79 Vieira, J., and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- 80 Walker, J.R., A. Kovarik, J.S. Allan, and R.A. Gustavson. 1975. Regulation of bacterial cell division: temperature sensitive mutants of *Escherichia coli* that are defective in septum formation. *J. Bacteriol.* **123**: 693-703.
- 81 Wachi, M. and M. Matsushashi. 1989. Negative control of cell division by *mreB*, a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **171**: 3123-3127.
- 82 Wang, H. and Gayda, R.C., 1992. Quantitative determination of FtsA at different growth rates in *Escherichia coli* using monoclonal antibodies. *Mol. Microbiol.* **6** 2517-2524.
- 83 Ward, J.E., and J. Lutkenhaus. 1985. Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. *Cell* **42**: 941-949.